

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Natalja Garber

23S rRNA tertsiaarse interaktsiooni piirkonna mutatsioonanalüüs

Magistritöö

Molekulaar- ja rakubioloogia eriala

30 EAP

Juhendaja: PhD Margus Leppik

TARTU 2016

23S rRNA tertsiaarse interaktsiooni piirkonna mutatsioonanalüüs

Magistritöö

Natalja Garber

Lühikokkuvõte. Ribosoom on keeruline ja suur kompleks, mis koosneb RNA-st ja valkudest. Ribosoom on leitud kõikidest identifitseeritud organismidest. Bakteri ribosoomi suur subühik koosneb 23S rRNA-st, 5S rRNA-st ja r-valkudest. Käesolevas töös selgitatakse, 23S rRNA domeenis II 1130 piirkonna mõju ribosoomile, suunatud punktmutageneesi abil. Kasvukiirus väheneb 23S rRNA mutatsioonide variantidel. Punktmutatsioonid põhjustavad 50S subühiku assambleerimise defekti ja polüsoomide vähenemise. Lisamutatsioon A1067T põhjustab suuremad defektid ribosoomile. Mutatsiooniga 23S rRNA hulk ribosoomi fraktsioonis on suurem 50S subühikus.

CERCS teaduseriala: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: ribosoom, 23S rRNA, suunatudmutagenees, 1130 piirkond, translatsioon

Mutagenesis analysis of the 23S rRNA tertiary interaction region

Master's thesis

Natalja Garber

Abstract. Ribosome is a complicated and a large complex, which consists of the RNA and proteins. Ribosome has been identified in all organisms. Large subunit of the bacterial ribosome is composed of the 23S rRNA, 5S rRNA and r-proteins. In this work I use site-directed mutagenesis to study the influence of the 1130 region of 23S rRNA, which is located in domain II on the ribosome. Growth rate decreases in expression of the 23S rRNA mutation variants in the cells. Site-directed mutations have an influence on the 50S subunit assembly. Extra mutations A1067T has bigger influence on 50S subunit assembly and translation. Distribution of 23S rRNA mutation is large in the 50S subunit.

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis

Keywords: ribosome, 23S rRNA, site directed mutagenesis, 1130 region, translation

Sisukord

Sisukord	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus.....	6
Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Ribosoomi struktuur	7
1.1.1 Ribosoomi väikese subühiku struktuur	9
1.1.2 Ribosoomi suure subühiku struktuur	11
1.2 Translatsioon	16
1.2.1 Translatsiooni initsiatsioon.....	17
1.2.2 Translatsiooni elongatsioon.....	19
1.2.3 Translatsiooni terminatsioon	20
1.2.4 Ribosoomi taaskasutamine	21
2. Eksperimentaalne osa	22
2.1 Töö eesmärk	22
2.2 Materjal ja meetodika	23
2.2.1 Kloneerimine	24
2.2.2 Bakterirakkude generatsiooniaja määramine	28
2.2.3 Rakkude kasvatamine ja lüüs	28
2.2.4 Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosigradiendist.....	29
2.2.5 Ribosomaalsete subühikute sadestamine.....	29
2.2.6 rRNA puhastamine ribosomaalsetest partiklitest	29
2.2.7 Praimeri kineerimine	30
2.2.8 Minisekveneerimine	30

2.3 Tulemused.....	31
2.3.1 Mutantseid 23S rRNA variante sisaldavate plasmidekonstrueerimine	31
2.3.2 23S rRNA 1130 regiooni mutatsioonide mõju rakkude kasvufenotübile ..	32
2.3.3 23S rRNA 1130 piirkonna mutatsioonide mõju ribosoomiprofiilidele	34
2.3.4 Plasmidilt ekspresseeritud 23S rRNA jaotus ribosomaalsetes fraktsioonides.	38
2.4 Arutelu	40
Kokkuvõte.....	44
Summary	45
Tänuavaldused	47
Kasutatud kirjandus	48
Kasutatud veebiaadressid.....	55
Lisad	56
Lisa 1	56
Lisa 2.....	57
Lihtlitsents	58

Kasutatud lühendid

30S- prokarüoodi ribosoomi väike subühik

50S- prokarüoodi ribosoomi suur subühik

70S- prokarüoodi ribosoom

Amp- ampitsiliin

ddNTP- didesoksünukleotiidid

FS- formamiidi stop

GAC- GTPaasi tsenter

HB- hübridisatsiooni puhver

IPTG- isopropüültio- β -D-galaktosiid

LLP- lüüsi lahjenduspuhver

PNK- T4 polünukleotiid kinaas

PTC- peptidüültransferaasne tsenter

RB- reaktsiooni puhver

RluC- ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas C

RluD- ribosoomi suure subühiku pseudouridiini süntaas D

rRNA- ribosomaalne RNA

RT- pöördtranskriptaas

RT-STOP- pöördtranskriptaasi stop

SRL- sarcin-ricin ling

U- ühik (optiline tihedus A_{260})

β -ME- 2-merkaptetanool

Sissejuhatus

Ribosoom on keeruline ja suur kompleks, mis koosneb RNA-st ja valkudest. Ribosoom on leitud kõikidest identifitseeritud organismidest. Bakteri ribosoom koosneb kahest ebavõrdse suurusega subühikust: väikesest 30S subühikust, mis vastutab mRNA dekodeerimise eest ja suurest 50S subühikust, mis katalüüsib peptiidsideme moodustumist. Mõlemad subühikud koosnevad ribosomaalsetest RNA-st (rRNA) ja ribosoomalsest valkudest (r-valk) (VanLoock jt., 2000).

Translatsioon on protsess, mille jooksul ribosoom tõlgendab mRNA-s oleva nukleotiidses järjestuses valgu aminohappeliseks järjestuseks (Lafontaine ja Tollervey, 2001). Valgusünteesi võib jagada alametappideks: translatsiooni initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja ribosoomi taaskasutamine (Frank ja Spahn, 2006).

Oma bakalaureusetöö raames identifitseerisin positsioonid, millesse kimäärne ensüüm RluCD sünteesib pseudouridiinid. Kimäärne valk oli konstrueeritud RluC N-terminaalsest domeenist ja RluD C-terminaalsest domeenist. Osades positsioonides tuvastasime, et pseudouridiin on oluliselt rohkem partiklites, mis ei ole korektselt assambleeritud 50S subühikuks võrrelduna funktsionaalsete 70S partiklitega. Selline pseudouridiinide interferents 23S rRNA-s võimaldab püstitada hüpoteesi, mille alusel positsioonid, milles leidsime pseudouridiinide interferentsid on olulised ribosoomi biogeneesi seisukohast (Garber, 2014). Kuna on teada, et pseudouridiinid võivad stabiliseerida rRNA struktuure, siis on alust spekulatsioonideks, et ebaspetsiifiliselt sünteesitud pseudouridiinid võivad olla põhjuseks, miks RluCD põhjustab 50S subühiku assambleerumise defekte (Garber, 2014). Üheks huvipakkuvaks regiooniks 23S rRNA struktuuris on 1130 piirkond. Selle regiooni lähedal on GTPaasi tsenter ja „U-pööre“, kus mutatsioonid võivad põhjustada ribosomaalse aktiivsuse langevust (Baranov jt., 1998).

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada 23S rRNA domeeni II 1130 regiooni suunatud mutageneesi abil, et kontrollida hüpoteesi, mille järgi selles rRNA piirkonnas bakalaureuse töö raames leitud interfereeruvad pseudouridiinid, põhjustavad defekte ribosoomi 50S partikli biogeneesiks.

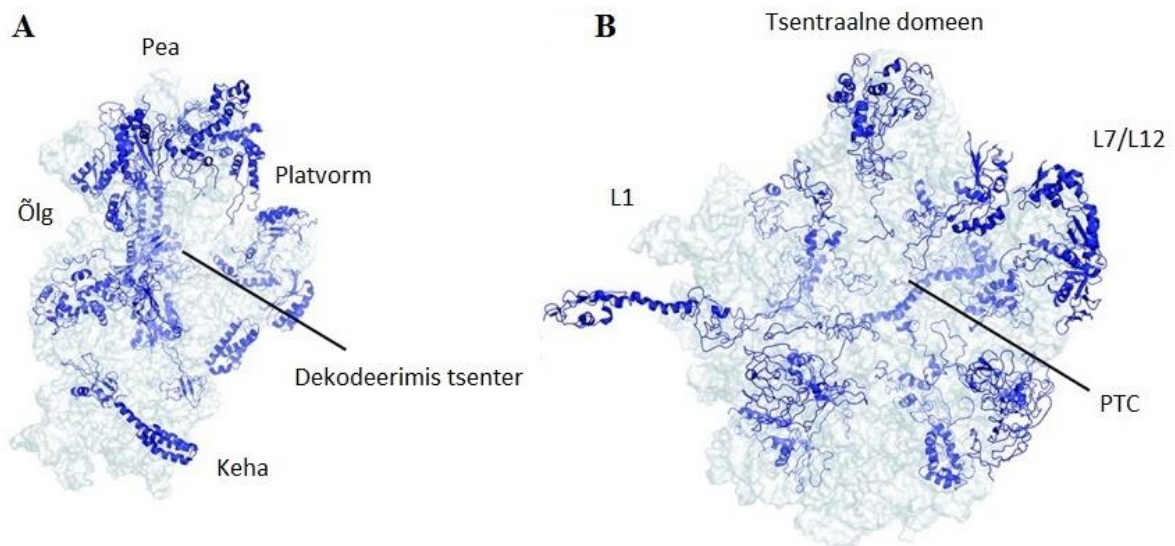
Kirjanduse ülevaade

1.1 Ribosoomi struktuur

Ribosoom vastutab valgusünteesi eest kõikides elurakkudes. Valgusüntees on kogu elutegevuse alus. Ribosoom tõlgib mRNA-s sisalduva nukleotiidses järjestuses valgus aminosahharaid järjestuseks. Eukarüootne ribosoom on suurem võrreldes prokarüootse ribosoomiga ja see tähendab, et eukarüootsed ribosoomid koosnevad suuremast arvust r-alkudest ja on kompleksamad, kui prokarüootsed ribosoomid (Frank, 2000).

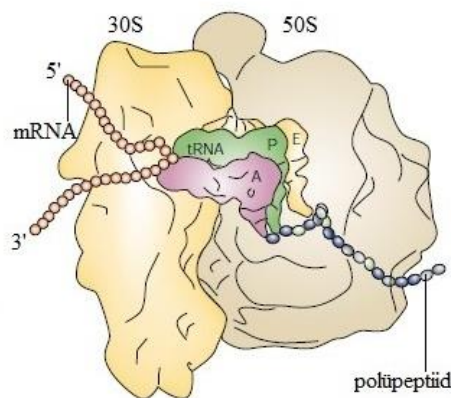
On teada, et ribosoom on kõige suurem looduslik ribosüüm, mis omab sünteetilist aktiivsust (Rodnina jt., 2006). Bakteri rakus on umbes 20000 ribosoomi, mis moodustuvad ühe neljandiku kogu raku massist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22335/#A4167>). *E. coli* ribosoomi mass on umbes 2700 kDa, diameeter 200 Å ja sedimentatsiooni koefitsient 70S (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22335/#A4167>) (Svedberdi ühikutes), mis iseloomustab osakeste sedimentatsiooni tsentrifuugimise teel. Sedimentatsioon sõltub molekuli massist ja tema geomeetrisest vormist. (https://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg_unit.html). Funktsionaalne 70S ribosoom sisaldab kahte subühikut: suurt (50S) ja väikest (30S) (joonis 1 A ja B). 30S subühik koosneb 21 erinevast valgust (S1 – S21) ja 16S RNA molekulist, mis on ~1500 nt pikk. 50S subühik sisaldab 34 valku (L1 – L34) ja kahte RNA molekuli, 23S (~2900 nt) ja 5S (~120 nt) RNA-d (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22335/#A4167>).

Peale rRNA sisaldavad rakud veel kahte valgusünteesiks vajalikku RNA-d, need on „messenger“ RNA (mRNA) ja transport RNA (tRNA). mRNA põhiliseks funktsiooniks on viia DNA-s talletatud informatsioon ribosoomi, tRNA transpordib valgusünteesiks vajalikud aminosahharaid ja rRNA üheks funktsiooniks on vahendada mRNA ja tRNA omavahelist interaktsiooni, et toimuks korrektne valgusüntees (Brimacombe ja Stiege, 1985) (<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/502158/ribosomal-RNA-rRNA>). Valgusünteesi jooksul liiguvad mRNA ja tRNA kindlat teed mööda läbi ribosoomi (Noller jt., 2002). Translatsiooni protsess on kiire, ühe sekundi jooksul lisatakse sünteesitavasse peptiidi 10-20 aminosahhara ühe ribosoomi kohta (Wilson jt., 2002).



Joonis 1. Ribosomaalsed subühikud ja nende struktuur. **A:** Joonisel on näidatud 30S subühik, kus on tähistatud väikse subühiku eristatavad morfoloogilised elemendid: pea, platvorm, keha ja õlg. Sirge joonega on tähistatud dekodeerimis tseenter. **B:** Joonisel on 50S subühik, näidatud on L1, tsentraalne ja L7/L12 külmud. Sirge joonega on tähistatud peptidüültransferaasne tseenter. Joonistel on rRNA hall ja ribosomaalsed valgud sinised. Joonis on kohandatud artiklist Kaczanowska ja Ryde'n-Aulin, 2007.

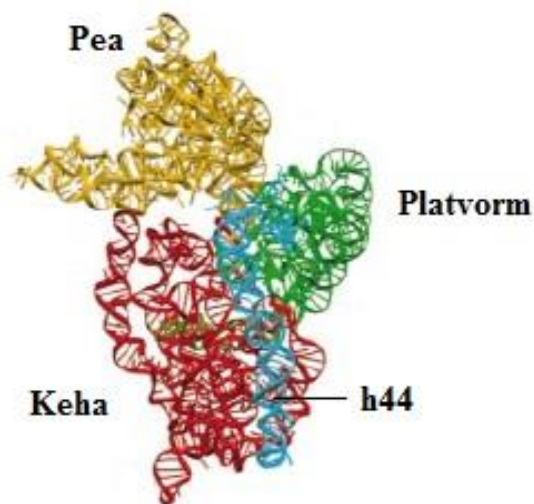
Ribosoomis on kolm tRNA seondumissaiti, mida tuntakse vastavalt sellele, millist tRNA-d need seovad. A ja P sait on afiinsed vastavalt aminoatsüül ja peptidüül tRNA suhtes ja E sait on afiinne deatsüleeritud tRNA suhtes (joonis 2) (Noller jt., 2002; Wilson jt., 2002). tRNA seondumissaidid on olemas mõlemas subühikus (joonis 2) (Wilson ja Nierhaus, 2003; Márquez jt., 2002; Janssen jt., 2012). Seondumissaidid on väga olulised tRNA jaoks ja veel mängivad nad rolli translatsioonis (Noller jt., 2002). Kuidas see mehhanism täpsemalt töötab on kirjeldatud translatsiooni elongatsiooni peatükis.



Joonis 2. tRNA seondumissaidid ribosoomis. Joonisel on kujutatud tRNA seondumissaitide (A, P ja E) paiknemine ribosoomi mõlemas subühikus (joonisel tähistatud vastavalt 30S ja 50S). Joonisel on lisaks näidatud mRNA ja kasvav polüpeptiid. A-saidi tRNA on näidatud lillana, P-saidi tRNA rohelisena ja E-saidi tRNA kollasena. Joonis on kohandatud artiklist Lafontaine ja Tollervey, 2001.

1.1.1 Ribosoomi väikese subühiku struktuur

Prokarüootne ribosoomi väike subühik sisaldab 16S rRNA-d ja temale vastavaid valke. 16S rRNA sekundaarstruktuuris on eristatavad neli põhilist domeeni: 5' domeen, tsentraalne domeen (C), 3' suur domeen (3'M) ja 3' väike domeen (3'm) (lisa 1) (Wittmann, 1982; Xu ja Culver, 2010). 5' domeen sisaldab 16S rRNA heelikseid 1-18; tsentraalne domeen sisaldab heelikseid 19-27; 3' suur domeen heelikseid 28-43 ja 3' väike domeen heelikseid 44 ja 45 (Wimberly jt., 2000). 30S tertsiaarstruktuuris on eristunud morfoloogilised elemendid, mille moodustavad 16S rRNA sekundaarstruktuuris erinevad domeenid. Keha moodustub 16S rRNA 5' domeen, platvormi moodustab tsentraalne domeen, pea moodustab 3'suur domeen (joonis 3).

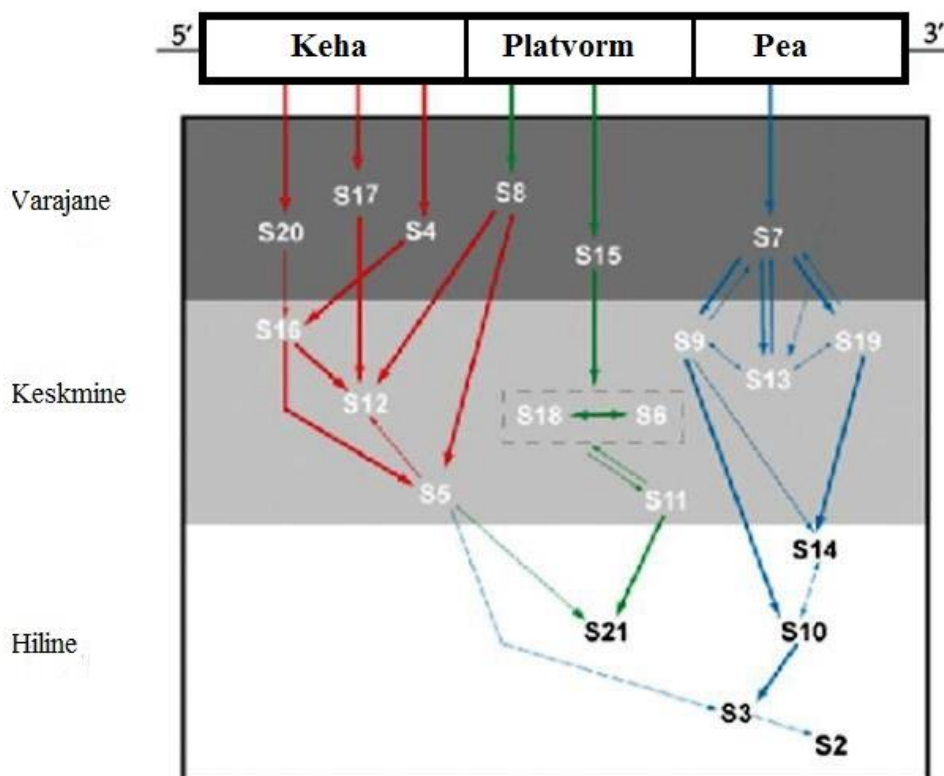


Joonis 3. 16S rRNA tertsiaarstruktuur 30S ribosomaalses subühikus. Joonisel on kollasega märgitud 3' suur domeen, mis moodustab 30S subühiku pea; punane on 5' domeen, mis moodustab keha ja roheline on tsentraalne domeen, mis moodustab platvormi. Sinisega on märgitud h44, mis asub 3' väikeses domeenis. Joonis on kohandatud artiklist Wimberly jt., 2000.

30S subühikus on mitmeid 12S rRNA heelikseid, millel on translatsiooni seisukohast oluline roll. Näiteks heelikseid 23 ja 24 (lisa 1), mis asuvad 30S subühiku tsentraalses domeenis, on hädavajalikud struktuurid tRNA seondumiseks P-saiti ja subühiku assotsieerumiseks 50S subühikuga. Tsentraalses domeenis on veel heeliks 27 (lisa 1), mis on oluline translatsiooni täpsuse seisukohast (Clemons jt., 1999). 3' väikeses domeenis asub heeliks 44 (lisa 1), mis on 16S rRNA kõige pikem heeliks ja see vastutab enamuse 30S subühiku poolsete subühikute vaheliste kontaktide eest (Wimberly jt., 2000; Ramakrishnan, 2008).

Nagu eelpool mainitud, sisaldab 30S subühik 21 valku. Nende interaktsioonid 16S rRNA-ga on vajalikud funktsionaalse subühiku moodustumiseks (Talkington jt., 2005; Xu ja Culver, 2010). 16S rRNA ja valkude assambleerimise uuringud on näidanud, et 30S subühiku assambleerimise protsessi saab jagada kolmeks etapiks: varajane, keskmine ja hiline etapp. Varajases etapis interakteeruvad 16S rRNA-ga valgud S4, S7, S8, S15, S17 ja S20, keskmises etapis valgud S5, S6, S9, S11, S12, S13, S16, S18 ja S19 ja hilises etapis valgud S2, S3, S10, S14 ja S21 (joonis 4). Kõikides etappides ribosomaalsete valkude assotsieerumine 16S rRNA-

ga põhjustab 16S rRNA konformatsioonilisi muutuseid, mis on vajalikud lõpliku funktsionaalse 30S struktuuri moodustumiseks (Xu ja Culver, 2010).



Joonis 4. 30S subühiku valkude assambleerimise kaart. Joonisel on skeem, mis näitab s-valkude assambleerimise järjekorda. Noolte värvidega on näidatud, milliste 30S subühiku morfoloogiliste elementide tekkimiseks vastavate valkude interaktsioonid vajalikud on: keha (punane), platvormi (rohelised) ja pea (sinised). Joonis on kohandatud artiklist Xu ja Culver, 2010.

1.1.2 Ribosoomi suure subühiku struktuur

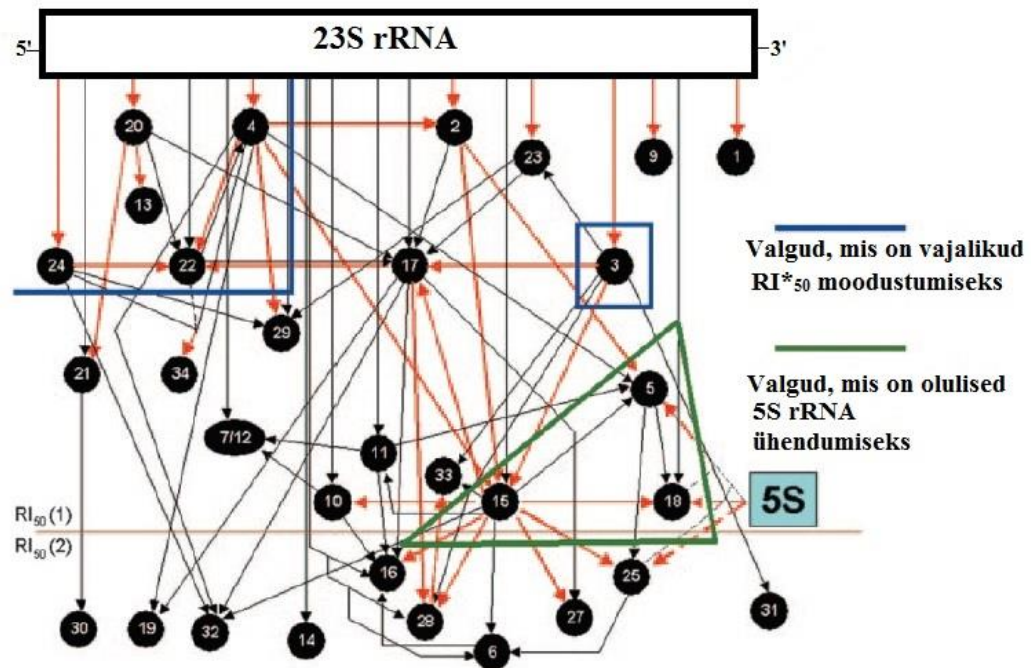
50S subühik koosneb 23S rRNA-st ja 5S rRNA-st (lisa 2) ja nendega interakteeruvatest valkudest (Ban jt., 2000; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). 23S rRNA sekundaarstruktuur koosneb kuuest domeenist (I-VI) (lisa 2), mis on tertsiaarstruktuuris omavahel väga tihedalt interakteerunud (täpsemalt on domeenide struktuur kirjeldatud allpool). Ribosoomi suur subühik kujutab endast massiivset ja paindmatut struktuuri, võrreldes 30S-ga. 50S subühikust välja ulatuvad 3 kühmu (joonis 1B), L1 kühm vasakul, L7/L12 kühm paremal ja tsentraalne kühm keskel, vaadates subühikutevahelise pinna poolt (joonis 1B) (Zhao jt., 2004).

L1 kühm koosneb 23S rRNA heeliksidest 76-78 ja r-valgust L1. L1 interakteerub E-saidis oleva tRNA-ga ja on spekuleeritud, et L1 kühm on vajalik tRNA dissotseerimiseks ribosoomist (Gao jt., 2003; Nikulin jt., 2003; Valle jt., 2003). *E. coli* ribosoomi L7/L12 kühm (joonis 1B) koosneb valgust L10 ja neljast koopiast valgust L7/L12 ning see vastutab translatsiooni faktorite seondumise eest ribosoomile (Briones jt., 1998; Gao jt., 2003; Helgstrand jt., 2006). 23S rRNA heeliksid 43 ja 44 (1051-1108 nt) koos L11 valguga moodustavad GTPaasse tsentri (GAC), mis tagab GTPaasete ribosomaalsete faktorite seondumise ribosoomile (Li jt., 2006). Tsentraalne kühm asub L1 ja L7/L12 kühmu vahel ja kontakteerub translatsiooni käigus 30S subühiku peaga (Yusupov jt., 2001). *E. coli*-s tsentraalne kühm koosneb 5S rRNA-st, 23S rRNA, domeenide II ja V osadest ning L5, L18, L25 ja L31 ribosomaalsetest valkudest (Gao jt., 2003; Zhao jt., 2004).

Peptidüültransferaasne tsenter (PTC) on ribosoomi katalüütiline tsenter, mis mängib kesksel rollil valgusünteesimises. PTC on 50S subühiku osa (joonis 1B). Peamine PTC funktsioon on kovalentselt siduda aminohapped polüpeptiidideks peptiidsidemete kaudu (Polacek ja Mankin, 2005; Beringer ja Rodnina, 2007). PTC-st saab alguse 100Å pikkune ja keskmiselt 15Å läbimõõduga tunnel (kulgeb läbi subühiku subühikute vahelise pinna poolt tahapoole), mille kaudu ribosoomist väljub kasvav peptiid. Tunneli moodustab põhiliselt 23S rRNA domeen V (Nissen jt., 2000).

Suure subühiku assambleerimine on sarnane 30S subühiku assambleerimisega, aga 50S partikli moodustumises osaleb rohkem valke, mis viitab sellele, et see protsess on keerulisem (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). 23S rRNA on kaks korda suurem kui 16S rRNA ja 23S rRNA peab 50S subühiku moodustumiseks korrektselt interakteeruma veel 5S rRNA-ga, samal ajal kui 16S rRNA-l 30S subühiku moodustumises on vaja interakteeruda ainult valkudega. Funktsionaalne 50S subühik on võimalik rekonstrueerida puhastatud ribosomaalsetest komponentidest (5S ja 23S rRNA ning r-valgud). Rekonstruktsiooni protsess koosneb neljast etapist, millele on vaja kindlaid reaktsiooni tingimusi. Esiteks, inkubeerides 23S rRNA, 5S rRNA ja L-valke, (joonis 5, ülevalpool roosat joont) moodustub RI₅₀(1) partikkel, mis sedimenteerub 33S-na. Temperatuuri tõstmine 44°C-ni põhjustab konformatsioonilised muutused, misjärel moodustub partikkel (RI*₅₀), mis sedimenteerub 41S-na. Ülejäänud L-valkude lisamine viib selleni, et moodustub RI₅₀(2), mis sedimenteerub 48S-na. Lõpliku konformatsiooni moodustumiseks on vaja struktuurseid muutuseid, mis tekkivad partiklite kuumutamisel 50°C juures ja kõrgel 20mM Mg kontsentratsioonil (joonis

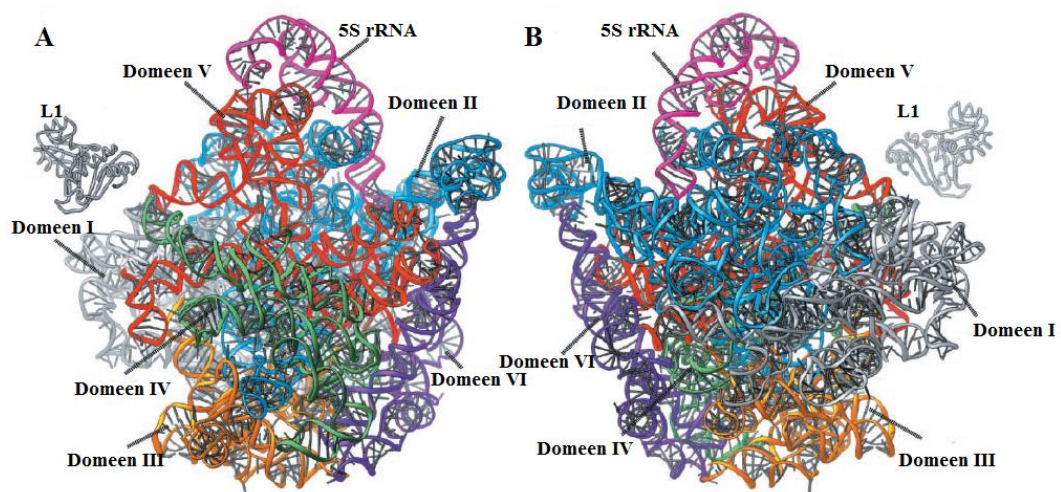
5). Selliste uuringute abil on kindlaks tehtud, et valgud L3 (interakteerub 23S rRNA IV domeeniga) ja L24 (interakteerub 23S rRNA I domeeniga) alustavad assambleerimise protsessi ja on hädavajalikud korrektseks 50S partikli assambleerimise alustamiseks (Herold ja Nierhaus, 1987).



Joonis 5. 50S subühiku assambleerimise kaart. Joonisel on kujutatud ribosomaalseid valke, mis on vajalikud 50S subühiku moodustumiseks. Oranži värviga nooled tähistavad tugevat seondumist suure ribosomaalse subühikuga ja mustad tähistavad nõrka seondumist. Roosa joon eristab kahte assambleerimise vaheolekut RI₅₀(1) ja RI₅₀(2). Joonis on kohandatud artiklist Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007.

23S rRNA sisaldab kuut domeeni. Domeen I (nt 1-561, 2895-2904), mis sisaldab heelikseid 1-25. Domeen I asub 50S partikli tagaküljes, L1 kühmu taga ja all (joonis 6). On teada, et need valgud, mis seonduvad 23S rRNA 5' terminaalise osaga assambleeruvad varem, kui need mis seonduvad 3' osaga (Klein jt., 2004). See tähendab, et 50S subühiku assambleerimine algab 23S rRNA domeenist I. Domeeniga I interakteeruvad järgmised valgud: L4, L15e, L22, L24, L29 ja L24. On teada, et L24 mängib kriitilise rolli ribosoomi assambleerimises (Klein jt., 2004). Domeen I interakteerub tertsiaarstruktuuris tugevasti domeenidega II, V ja VI-ga (Petrov jt., 2013).

Domeen II (nt 587-1250) on 23S rRNA kuuest domeenist kõige suurem ja see asub pigem 50S partikli tagapooles (joonis 6). Selles domeenis on kolm väljaulatuvat osa. Üks nendest (heelikseid 42-44) moodustab osa 23S rRNA L7/L12 kühmust, mis interakteerub elongatsiooni faktoritega. Heeliks 41-42 ja nukleotiidid 1137-1138 ja 1005-1006 (lisa 2) on olulised „U-pöörde“ moodustamisel, mis on vajalik GTPaasse tsentri (H43-44) (Li jt., 2006) korrektseks lokaliseerimiseks tertsiaarstruktuuris (Baranov jt., 1998). Lisaks eelnevale asub 23S rRNA-s 1130 regioon, mis 3D struktuuri järgi asub PTC lähedal (Petrov jt., 2013). Mutatsioonid selles piirkonnas võivad põhjustada ribosoomi aktiivsuse langust (Baranov jt., 1998). Teise väljaulatuva osa moodustab H38. See asub 50S partikli tagapooles ja asub 50S tertsiaarstruktuuris 5S rRNA ja domeeni V vahel. Kolmanda väljaulatuva osa moodustavad heelikseid 32-35, mis annavad subühikute assotsieerimisel kontakte väikese subühikuga (Ban jt., 2000). 23S rRNA domeen II interakteerub tugevasti domeenidega III, IV, V, VI ja I (Petrov jt., 2013).



Joonis 6. 23S rRNA sekundaarstruktuuris eristuvate domeenide lokaliseerimine 50S subühiku tertsiaarstruktuuris. Joonisel on kujundatud 23S rRNA sekundaarstruktuuri domeenid pakituna 50S subühiku tertsiaarstruktuuri. Halliga on värvitud domeen I; helesinine on domeen II; oranž - domeen III; roheline - domeen IV; punane - domeen V ja lilla - domeen VI. 5S rRNA on tähistatud roosa värviga. **A:** Vaade subühikutevahelisi kontakte moodustuvalt poolelt. **B:** Vaade solvendi poolt (paneelil A oleva joonise vaade keeratud 180°). Joonis on kohandatud artiklist Ban jt., 2000.

Domeen III (nt 1271-1647) on kompaktne globulaarne domeen, mis asub 50S subühiku L1 kühm regiooni all (joonis 6). Domeeni moodustavad 23S rRNA H47-60. Domeen III näeb välja nagu neljatipuline tärn, mille tipud moodustavad heelikseid 48, 52, 57

ja 58. Tertsiaarstruktuuris interakteerub domeen III kõige rohkem domeeniga II. Samuti kontakteerub domeen III 23S rRNA domeenidega I, IV ja VI (Ban jt., 2000).

Domeen IV (nt 1679-1989) asub 50S subühiku keskel (joonis 6) ja see annab translatsiooni ajal palju interaktsioone 30S subühikuga. Domeen IV sisaldab heelikseid 61-71 ja see on 23S rRNA regioon, millega ei seonu ükski valk. Kõige huvitavam heeliks IV domeenis on H69. Heeliks 69 asub domeeni keskel ja interakteerub 16S rRNA heeliksiga (h44) (joonis 3) väikeses ribosomaalses subühikus, moodustades subühikuvahelise silla B2a (Ban jt., 2000; Liu ja Fredrick, 2015). Selles heeliksis asuvad pseudoridiinid positsioonides 1911, 1915 ja 1917, mille modifitseerimise eest vastutab pseudouridiini süntaas RluD (Gutsell jt., 2005). RluD on väga oluline, kuna *rluD* geeni deleteerimine põhjustab rakkude aeglase kasvu fenotüüpi ja subühikute assambleerimise defekti (Ofengand jt., 2001; Gutsell jt., 2005). Kõige rohkem moodustab 23S rRNA domeen IV kontakte domeenidega III, V ja VI (Petrov jt., 2013).

Domeen V (nt 2058-2610) paikneb 50S tertsiaarstruktuuris domeenide IV ja II vahel ja asub 50S subühiku keskel (joonis 6). Domeeni moodustavad 23S rRNA heelikseid 72-93 (Ban jt., 2000). 23S rRNA domeenis V asub ribosoomi peptidüültransferaasne tsester ja PTC on translatsioonis keskse tähtsusega („süda“) (Hury jt., 2006). Struktuuri järgi võib domeeni V jagada kolmeks regiooniks: esimene regioon algab heeliksiga 75 ja moodustab seondumissaidi L1 valgule; teine, mis koosneb heeliksitest 80-88, moodustab koos 5S rRNA ja osaga 23S rRNA domeenist II tsentraalse kühmu; kolmas regioon sisaldab H89-93 ja aitab stabiliseerida ribosoomi elongatsiooni faktorite seondumissaiti (Ban jt., 2000). Domeen V kontakteerub kõikide teiste 23S rRNA domeenidega (Petrov jt., 2013).

Domeen VI (nt 2667-2914; H95-101) on kõige väiksem 23S rRNA domeen, mis paikneb kohe 50S subühiku L7/L12 kühmu all (joonis 6) (Ban jt., 2000). Domeenis VI asub heeliks 95 (nt 2653-2667), mida tuntakse ka sarcin-ricin linguna (SRL). SRL mängib rolli elongatsiooni faktorite seondumises ribosoomiga (Ban jt., 2000; Miyoshi ja Uchiumi, 2008). SRL täpne funktsionaalne roll ei ole päris selge, aga Shi jt., 2012 leidis, et mutatsioonid SRL piirkonnas põhjustavad valgusünteesi inaktiveerumise ja on seetõttu rakule letaalsed. Kõige rohkem interakteerub 23S rRNA domeen VI domeeniga V (Petrov jt., 2013).

1.2 Translatsioon

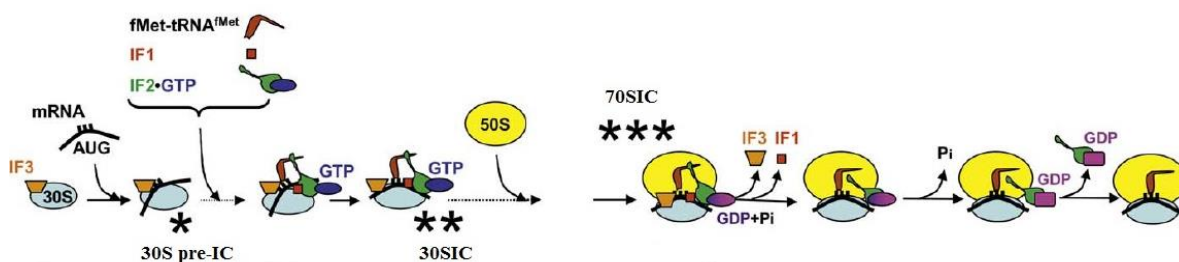
Translatsioon ehk valgusüntees on protsess, mis on tsentraalse tähtsusega rakku funktsioneerimisel ja on väga konserveerunud kõikides elusorganismides. See on molekulaarbioloogia põhidogmast viimane etapp, informatsiooni ülekandes DNA-st valkudesse (Zouridis ja Hatzimanikatis, 2007). Translatsioon on mitmeetapiline ja keeruline protsess, mille toimumiseks on lisaks ribosoomile vaja veel mitmete GTP-d hüdroolüüsivate valkude osavõtt erinevates translatsiooni protsessi etappides (Wimberly jt., 2000). Translatsiooni protsess koosneb: ribosoomi seondumisest mRNA nukleotiidsele initsiatsiooni järjestusele, mis alati asub mRNA 5'otsas; ribosoomi liikumisest ühe koodoni kaupa mööda mRNA-d translokatsiooni ajal ja lõpuks peale ribosoomi jõudmist mRNA terminatsiooni koodonini polüpeptiidi ja ribosoomi vabastamine (Arnstein ja Cox, 1992). 30S subühiku ülesanne on mRNA järjestuse dekodeerimine, kontrollides mRNA koodoni õige aluspaardumise tRNA antikoodon järjestusega. 50S subühik katalüüsib peptiidsideme moodustumist (Wimberly jt., 2000). Translatsioon on väga täpne ja kiire protsess (Wilson ja Nierhaus, 2003). 140 aminohappe pikkuse valgu sünteesimiseks kulub vaid umbes 20 sekundit (Arnstein ja Cox, 1992).

Oluline etapp valgusünteesil on peptidüültransferaasne (PT) reaktsioon, mille jooksul kantakse peptiidahel peptidüül-tRNA-lt, mis asub ribosoomi P-saidis (joonis 2), üle aminoatsüül-tRNA-le, mis asub ribosoomi A-saidis. Selle protsessi tulemusena moodustub uus peptiidside ja valguahel pikeneb ühe aminohappe võrra. Selleks, et peptidüültransferaasi protsess toimuks, on vaja, et doonor ja aktseptor tRNA lingud paikneksid korrektselt suure ribosomaalse subühiku PT tsentris P- ja A-saitides (Bocchetta jt., 1998).

Translatsiooni jooksul toimuvad ribosoomis erinevad konformatsioonilised muutused. Ribosoomi väikese subühiku heeliks 44, pea, õlg ja platvorm (joonis 3) näitavad üles suurt konformatsioonilist liikuvust (Frank ja Spahn, 2006). 30S subühiku pea pöörab ribosoomi subühikute assotsiatsiooni, tRNA selektsiooni ja translokatsiooni jooksul. Võrreldes 30S subühikuga näitab 50S subühik üles väikest molekulisest liikuvust. Suure ribosomaalse subühiku kõige liikuvamad komponendid on L7/L12 kühm, L1 kühm, GTP-aasne tsenter ja valgu L9 C-terminaalne domeen (Frank ja Spahn, 2006).

1.2.1 Translatsiooni initsiatsioon

Initsiatsiooniks bakteris on vajalik 30S subühiku interaktsioon mRNA Shine-Dalgarno järjestusega, mis on komplementaarne 16S rRNA 3'otsaga (Ramakrishnan, 2002). Valgusünteesi initsiatsioon *E. coli*-s nõuab ribosoomi, mRNA, fMet-tRNA^{fMet}, initsiaator faktorite (IF1, IF2, IF3) ja GTP koordineeritud koostööd. On näidatud, et GTP ei mõjuta IF2 interaktsiooni fMet-tRNA-ga ja GTP-d ei ole vaja 30S initsiatsiooni kompleksi moodustumiseks, mis moodustub ka GDP juuresolekul (La Teana jt., 1996). Kui vaadata translatsiooni initsiatsiooni protsessi täpsemalt, siis initsiatsiooni jooksul moodustub kolm põhilist kompleksi: 30S pre-initsiatsiooni kompleks (pre-30SIC), 30S initsiatsiooni kompleks (30SIC) ja lõpuks 70S initsiatsiooni kompleks (70SIC) (joonis 7). Pre-30SIC koosneb 30S subühikust, mRNA-st ja initsiatsiooni faktorist 3 (joonis 7). Pre-30SIC kompleksis ei ole füüsilist interaktsiooni mRNA ja fMet-tRNA^{fMet} vahel. Selleks, et moodustuks 30S initsiatsiooni kompleks (30SIC), toimub konformatsiooniline muutus pre-30SIC-s, mis viib selleni, et toimub esimene interaktsioon mRNA koodoni ja initsiaator-tRNA antikoodoni vahel 30S subühiku P-saitis. Kui 30SIC-ga liitub 50S subühik moodustub 70S initsiatsiooni kompleks. 70SIC moodustumisega on ribosoom valmis edasi minema elongatsiooni faasi (joonis 7), sisaldades mRNA ja fMet-tRNA^{fMet} interaktsiooni 70S subühiku P-saidis (Myasnikov jt., 2009). Kui 70S kompleks on moodustunud ja initsiatsiooni faktorid vabastatakse ribosoomist, tekkinud kompleks on valmis korduvaks elongatsioonitsükliks (Wu jt., 1996).



Joonis 7. Prokarüootne translatsiooni initsiatsiooni skeem. Joonisel on kujutatud kolme põhilise initsiatsiooni kompleksi moodustumist. Esimene on 30S subühiku pre-initsiatsiooni kompleksi moodustumine (30S pre-IC), teine on 30S initsiatsiooni kompleksi moodustumine (30IC) ja viimaseks 70S initsiatsiooni kompleksi moodustumine (70IC). Kõik initsiatsiooni faktorid on vastavalt tähistatud. Joonis on kohandatud artiklist Myasnikov jt., 2009.

Initsiatsiooni protsessist võtavad osa 3 initsiatsiooni faktorid IF1, IF2 ja IF3. Igal initsiatsiooni faktoril on oma ülesanne (Ramakrishnan, 2002). IF1 on kolmest initsiatsiooni faktorist kõige väiksem (Pon ja Gualerzi, 1984). IF1 on monomeerne valk, mis koosneb 71 aminohappe jäägist. IF1 on väga konserveerunud element prokarüootses translatsiooni aparaadis. On leitud, et IF1 esineb ka mõnede taimede kloroplastides (Sette jt., 1997). On spekuleeritud, et IF1 vastutab IF2 ja IF3 faktorite aktiivsuse eest (Pon jt., 1979). Arnstein ja Cox järeldasid aastal 1992, et IF1 stimuleerib ribosoomi dissotsiatsiooni ja IF2 aktiivsust. Järgnevad uuringud on kinnitanud IF2 faktori sõltuvust IF1-st. IF2 aktiivsus langeb, kui IF1 puudub ja vastupidi kasvab, kui IF1 on olemas (Sette jt., 1997; Brock jt., 1998).

Translatsiooni initsiatsiooni faktor 2 (IF2) on kõige suurem initsiatsiooni faktor ja ta on *E. coli* elutegevuseks väga vajalik. IF2 taseme vähendamine rakkudes alla 50% normaalsest tasemest mõjutab rakkude kasvu, põhjustades aeglase kasvu fenotüüpe (La Teana jt., 1996). Cole ja teised konstrueerisid tüved, kus IF2 kodeeriv geen, *infB* oli *lac* promootori kontrolli all, mis võimaldas muuta IF2 taset, muutes söötmes IPTG kontsentratsiooni. Tulemused näitasid, et IPTG olemasolul kasvab rakk normaalse kiirusega ja vastupidi, IPTG puudumisel kasvukiirus on oluliselt vähenenud (Cole jt., 1987). IF2 omab kahte vormi: IF2 α (97kDa) ja IF2 β (79kDa). Mõlemad vormid on kodeeritud *infB* geeni poolt ja on vajalikud maksimaalse raku kasvukiiruse tagamiseks (Vornlocher jt., 1997). IF2 seondub 30S subühikule ja soodustab fMet-tRNA^{fMet} seondumist 30S pre-IC-ga, samuti stimuleerib IF2 30S ja 50S subühikute assotsiatsiooni (Tomšić jt., 2000; Myasnikov jt., 2009).

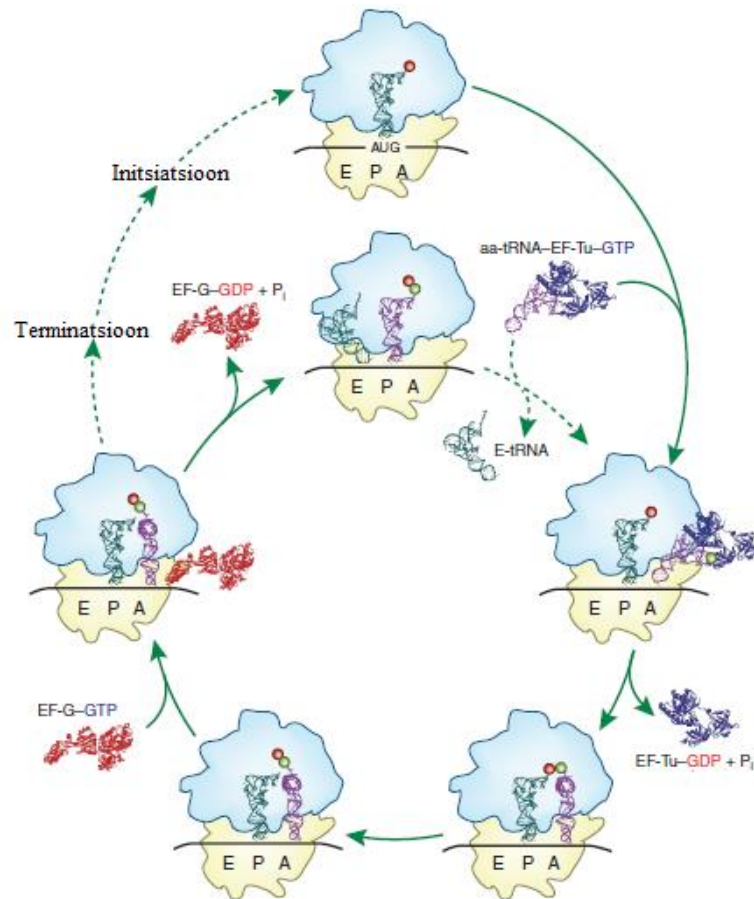
IF3 koosneb 180 aminohappest ja on kodeeritud *infC* geeni poolt (Garrett jt., 2000). IF3 koosneb kahest domeenist (C- ja N-terminaalne domeen) (Brock jt., 1998). Varasemad uuringud viitavad sellele, et põhiline IF3 seondumisregioon 30S subühikuga asub C-terminaalses domeenis ja väikese interaktsiooni koht on N-terminaalses domeenis, aga IF3 domeenide funktsioonid pole veel päris selged (Garrett jt., 2000). IF3 funktsioon translatsiooni initsiatsioonis on aidata siduda mRNA-d väikese ribosoomi subühikuga (Arnstein ja Cox, 1992).

Kõik initsiatsiooni faktorid annavad interaktsioone rRNA-ga (peamiselt 16S rRNA-ga) ja nende täpsem seondumiskoht 16S rRNA struktuuris on väga huvipakkuv küsimus. Moazed ja teised selgitasid, kuidas erinevate translatsiooni initsiatsiooni faktorite olemasolu mõjutab ribosoomi (16S rRNA-d). Tulemused näitasid, et IF2 faktori ei oma spetsiifilist interaktsiooni

kohta 16S rRNA-s, aga IF1 ja IF3 seonduvad positsioonile G530, A1408, A1493, A1492, G700, U701, G703, G791, U793, A819, G859 ja G1487. Tulemustest järel dati, et faktori seondumine nendele nukleotiidile tagab õige translatsiooni initsiatsiooni alguse (Moazed jt., 1995).

1.2.2 Translatsiooni elongatsioon

Ribosomaalse elongatsiooni tsükkel koosneb kolmest etapist: uue aminoatsüül-tRNA sidumine vastavalt dekodeerimis tsentris asuvale mRNA koodoni järjestusele, peptiidsideme moodustumine ja translokatsioon (joonis 8) (Dinos jt., 2005). Polüpeptiidi sünteesimise kiirus *in vivo* on 20 aminohapet sekundis ja *in vitro* 5 aminohapet sekundis. Elongatsiooni käigus on väga olulised kaks faktorit: elongatsiooni faktor Tu (EF-Tu) ja elongatsiooni faktor G (EF-G) (Frank ja Spahn, 2006; Rodnina ja Wintermeyer, 2016). Elongatsiooni esimene etapp on dekodeerimine ja korrektse tRNA A-saiti kinnitamine. Aminoatsüül-tRNA siseneb ribosoomil kolmikkompleksina elongatsiooni faktori EF-Tu ja GTP-ga. Selles protsessis on olulised 16S rRNA heeliks 44 asuvad nukleotiidid A1492 ja A1493, mis kontrollivad koodoni ja antikoodoni vahelise interaktsiooni geomeetriat. Lisaks nendele nukleotiididele on leitud, et *E. coli* väikeses ribosomaalses subühikus on ribosomaalne valk S12, mis mängib rolli translatsiooni täpsuses (Arnstein ja Cox, 1992). Teiseks etapiks on peptiidsideme moodustumine. Peptiidahel kantakse peptidüül-tRNA-lt, mis asub P-saidis, üle aa-tRNA-le, mis asub A-saidis (Joonis 8). Sellele järgneb kolmas etapp, translokatsioon (Arnstein ja Cox, 1992). A-saidis peale esimest peptiidsideme moodustumist on dipeptidüül-tRNA ja deatsüleeritud tRNA on P-saidis. See tähendab, et mõlemad saidid on kinni ja selleks, et oleks võimalik uue aminoatsüül-tRNA A-saiti sidumine on vajalik mRNA-tRNA kompleksi liikumine ühe koodoni võrra, et vabastada A-sait (joonis 8). tRNA-mRNA kompleksi liikumine toimub $A \rightarrow P$ saiti ja $P \rightarrow E$ saiti (Arnstein ja Cox, 1992). Translokatsiooniline liikumine nõuab EF-G-d ja on vaja GTP hüdrolyüsi (Rodnina ja Wintermeyer, 2016). Terve mRNA-tRNA kompleksi liikumine ühe koodoni võrra edasi on praegu veel pole lõpuni selge (Noller jt., 2002; Achenbach ja Nierhaus, 2013).



Joonis 8. Translatsiooni elongatsiooni tsükkel. Ülemises osas on kujutatud kuidas aminoatsüül-tRNA seondub kompleksis EF-Tu ja GTP-ga ribosoomi A saiti. Edasi, kantakse peptiid ahel üle peptidüül-tRNA-lt A-saidi tRNA-le, jättes deatsetüleeritud tRNA P-saiti. EF-G katalüüsib peptidüül-tRNA translokatsiooni A-saidist ja deatsetüleeritud tRNA P-saidist vastavalt P ja E-saiti. Joonis on kohandatud artiklist Achenbach ja Nierhaus, 2013.

1.2.3 Translatsiooni terminatsioon

Translatsiooni elongatsiooni tsükli reaktsioonid on konserveerunud, aga terminatsiooni faasi protsessid erinevad eukarüootides ja bakterites. Elongatsiooni käigus määrab mRNA koodon ära korrektse tRNA antikoodoni komplementaarsuse järgi, samas translatsiooni terminatsiooni käigus tunneb stop koodoni ära valk. Terminatsiooni faktorid on jagatud kaheks grupiks: esimene grupp dekodeerib stop koodoni ja katalüüsib peptiidsideme vabastamine P-saidi peptidüül-tRNA küljest, samal ajal kui teine grupp on G-valgud, mis vahendavad esimese grupi terminatsiooni faktorite vabastamist ribosoomist (Connell ja Nierhaus, 2000).

Ühe kolmest terminaator koodoni (UAA, UAG või UGA) jõudmine ribosoomi A- saiti põhjustab aminoatsüül-tRNA asemel valgulise terminatsiooni faktori seondumise ribosoomi. Prokarüootides vastutavad translatsiooni terminatsiooni eest kaks faktorit RF1 ja RF2, mis tunnevad ära STOP koodoneid (Frank ja Spahn, 2006). RF1 tunneb ära UAA ja UAG koodoni ning RF2 tunneb ära UAA ja UGA koodoni (Arnstein ja Cox, 1992). RF1 ja RF2 ribosoomi seondumine ja terminatsioon on RF3 faktori kontrolli all, mis töötab kompleksis GTP-ga ja vastutab RF1 ja RF2 dissotsieerumise eest ribosoomist (Arnstein ja Cox, 1992). RF3 sisaldab GTP seondumismotiivi, mis sarnaneb EF-Tu ja EF-G seondumismotiiviga ja kuulub RF3 suure G-alku perekonnale. Veel on teada, et RF3 tõstab stop signaali dekodeerimise efektiivsust (Garrett jt., 2000).

1.2.4 Ribosoomi taaskasutamine

Teine terminatsiooni faktori klass (RF3) suurendab esimest klassi terminatsioonifaktorite dissotsiatsiooni ribosoomist, põhjustades ribosoomi post-terminatsioonilise oleku, kus ribosoomis on mRNA ja P-saidis deatsetüleeritud tRNA. Selleks, et saaks toimuda uus initsiatsioon, on vajalik subühikute dissotsiatsioon, kaheks vabaks subühikuks (30S ja 50S). Ribosomaalsete subühikute dissotsieerimiseks seondub ribosoomile RRF (*ribosomal recycling factor*) kompleksis EF-G-ga (Frank ja Spahn, 2006; Borg jt., 2016). RRF on väga oluline prokarüootides, kuna ilma RRF-ta initsieeritakse translatsioon kohe peale stop koodonit uuesti (Selmer jt., 1999). Peale subühikute dissotsiatsiooni seondub 30S subühikuga initsiatsiooni faktor IF3, mis takistab enneaegselt 70S ribosoomi uuesti moodustumist. Millal täpselt deatsetüleeritud tRNA ja mRNA dissotseerivad 70S ribosoomist on veel teadmata (Borg jt., 2016).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärk

Valgusüntees on protsess, mis on tsentraalse tähtsusega rakku funktsioneerimisel ja on väga konserveerunud kõikides elusorganismides. See on molekulaarbioloogia põhidogmast viimane etapp, informatsiooni ülekandes DNA-st valkudesse (Zouridis ja Hatzimanikatis, 2007). Efektiivseks translatsiooni läbi viimiseks on vaja, et ribosoomi subühikud pannakse õigesti kokku.

Ensüümi RluCD ekspresseerimine *E. coli* rakkudes põhjustab 50S subühiku assambleerimise defekti. Ensüüm RluCD on kimäärne ensüüm, mis koosneb RluC N-terminaalsest domeenist ja RluD C-terminaalsest domeenist. RluCD sünteesib ebaspetsiifiliselt pseudouridiine 23S rRNA-sse. Kuna on teada, et pseudouridiinid võivad stabiliseerida rRNA struktuure, siis on alust spekulatsioonideks, et ebaspetsiifiliselt sünteesitud pseudouridiinid võivad olla põhjuseks, miks RluCD põhjustab 50S subühiku assambleerumise defekte. Oma bakalaureusetöö raames identifitseerisin positsioonid, millesse RluCD sünteesib pseudouridiinid. Osades positsioonides tuvastasime, et pseudouridiine on oluliselt rohkem partiklites, mis ei ole korrektselt assambleeritud võrrelduna funktsionaalsete 70S partiklitega. Selline pseudouridiinide interferents 23S rRNA-s võimaldab püstitada hüpoteesi, mille alusel positsioonid, milles leidsime interferentsid on olulised ribosoomi biogeneesi seisukohast (Garber, 2014).

Käesoleva töö eesmärgiks oli kontrollida hüpoteesi, mille järgi rRNA piirkonnad 1128, 1130 ja 1132, millest leiti bakalaureuse töö raames interfereeruvad pseudouridiinid, on olulised ribosoomi 50S partikli biogeneesiks.

2.2 Materjal ja metoodika

E. coli tüved

E. coli XL-1 blue (F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10 Tet^r*)

E. coli M15 (F-, Φ80Δ*lacM15*, *thi*-, *lac*-, *mtl*-, *recA*+, KmR) *Qiagen*

Plasmiid

Plasmiid ptBsB sisaldab BstEII-BamHI fragmenti *rrnB* operonist, mille ekspressioon on *tac* promootori kontrolli all. Plasmiid ptB on plasmiidi ptBB derivaat, mis sisaldab tervet *rrnB* operoni, mille ekspressioon on *tac* promootori kontrolli all (Leppik, 2007), plasmiidist on eemaldatud üks BamHI restriktiooni sait. Mõlemal plasmiidil on 23S rRNA heeliks-lingu 25 regiooni on lisatud streptavidiini siduvat ligandi kodeeriv DNA fragment (Leppik, 2007).

Kasutatud praimerid. Punasega on märgitud suunatud mutageneesi praimerite mutatsiooni koht.

Praimeri nimi	Oligonukleotiidi järjestus 5' – 3'
Oligod suunatud mutageneesi läbi viimiseks	
G1128C dir	5'-CGGCCTGCGCGGAACATGTAACGGGGC-3'
G1128C rev	5'-GCCCCGTTACATGTTCCGCGCAGGCCG-3'
G1128A dir	5'-CGGCCTGCGCGGAATAATGTAACGGGGC-3'
G1128A rev	5'-GCCCCGTTACATTTTCCGCGCAGGCCG-3'
G1128T dir	5'-CGGCCTGCGCGGAATATGTAACGGGGC-3'
G1128T rev	5'-GCCCCGTTACATATTCCGCGCAGGCCG-3'
U1130A dir	5'-GGCCTGCGCGGAAGAAGTAACGGGGC-3'
U1130A rev	5'-GCCCCGTTACTTCTTCCGCGCAGGCC-3'
U1130G dir	5'-GGCCTGCGCGGAAGAGGTAACGGGGC-3'

U1130G rev	5'-GCCCCGTTACCTCTTCCGCGCAGGCC-3'
U1130C dir	5'-GGCCTGCGCGGAAGACGTAACGGGGC-3'
U1130C rev	5'-GCCCCGTTACGTCTTCCGCGCAGGCC-3'
U1132A dir	5'-CTGCGCGGAAGATGAAACGGGGCTAAAC-3'
U1132A rev	5'-GTTTAGCCCCGTTTCATCTTCCGCGCAG-3'
U1132G dir	5'-CTGCGCGGAAGATGGAACGGGGCTAAAC-3'
U1132G rev	5'-GTTTAGCCCCGTTCCATCTTCCGCGCAG-3'
U1132C dir	5'-CTGCGCGGAAGATGCAACGGGGCTAAAC-3'
U1132C rev	5'-GTTTAGCCCCGTTGCATCTTCCGCGCAG-3'
Praimerid, mida kasutati PCR-iks ja sekveneerimiseks	
CD1	5'-AGCGGCGATGACCCCCTTAGAG-3'
C2	5'-GTCGGTTCGGTCCTCCAG-3'
C3	5'-AGTAACACCAAGTACAGG-3'
MINI TAG	5'-CAAAAGGTACGCAGT-3'

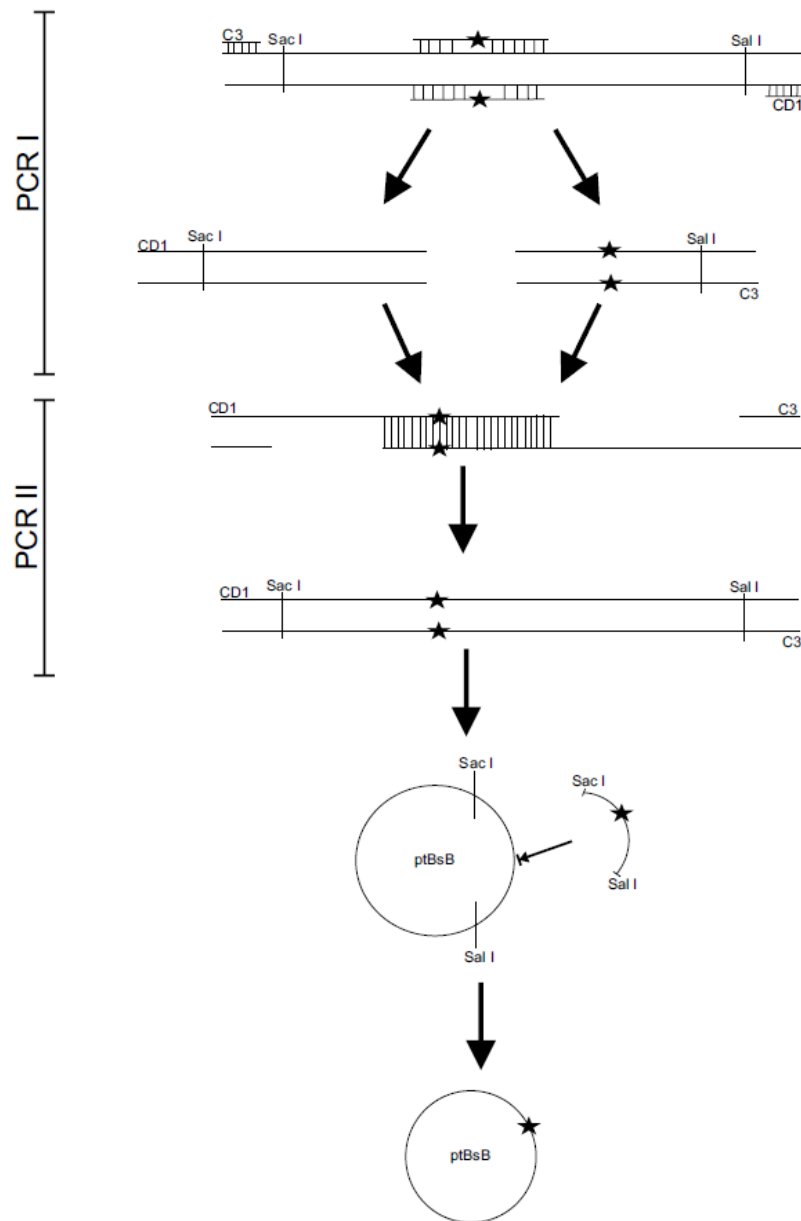
2xYT Sööde

1,6% trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl.

2.2.1 Kloneerimine

PCR reaktsioonideks kasutati *Phusion*TM polümeraasi (*ThermoFisher*) ja Taq DNA polümeraasi (*TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool*). PCR reaktsioonid viidi läbi *Biometra Uno II* termotsükleris ja vajalikud oligonukleotiidid telliti firmast *DNA Technology*. Kõik DNA restriksioonid ja ligatsioonid viidi läbi *ThermoFischer Scientific* ensüümidega, vastavalt tootja poolt ette nähtud tingimustele.

Uurimistöö jaoks oluliste punktmutatsioonide sisse viimiseks 23S rRNA geeni kasutati suunatud mutageneesi (joonis 9). Selle meetodiga viidi mutatsioonid 23S rRNA II domeeni, kus positsioonis 1128, muudeti G nukleotiid A, C ja U nukleotiidiks, positsioonis 1130, muudeti U nukleotiid A, C ja G nukleotiidiks ja positsioonis 1132, muudeti U nukleotiid muudeti A, C ja G nukleotiidiks.



Joonis 9. Suunatud mutageneesi skeem. Joonisel on skemaatilised kujutatud huvi pakkuva mutatsiooni viimine ptBsB plasmiidilt kodeeritavasse 23S rRNA geeni suunatud mutageneesi meetodil. Tärniga on tähistatud mutatsioon, mis asub 23S rRNA II domeenis. Sac I ja Sal I on restriktatsiooni ensüümid. CD1 ja C3 on praimerid. PCR I ja PCR II tähistab kloneerimise kahte etappi, mis olid vajalikud mutatsiooni viimiseks kloneeritavasse fragmenti.

DNA fragmentide amplifitseerimine PCR meetodil. Suunatud mutagenees toimus kahes osas, nagu kujutatud joonisel 9. Suunatud mutageneesi PCR-i reaktsioonid viidi läbi lõppmahus 50 µl kasutades 2U *Phusion* DNA polümeraasi (*ThermoFisher*), tootja poolt ette nähtud puhvris. Reaktsioonisegu sisaldas 1 ng ptBsB plasmiidset DNA-d, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 20 pmol praimereid. PCR reaktsioon viidi läbi järgmistel tingimustel: 4 min, 95°C; järgmisena 30 tsüklit: 40 s, 95 °C; 40 s, 54 °C; 1 min 20 s, 72 °C. Peale viimast tsüklit inkubeeriti reaktsioonisegu lisaks 5 min, 72 °C, et DNA süntees kindlasti lõppenud oleks.

Korrektse suurusega PCR produktide identifitseerimiseks ja puhastamiseks lahutati PCR-i produktid 0,8% agarosgeelelektroforeesil (*MetaPhorTM*) 1xTBE puhvris. DNA fragmendid puhastati agarosgeelist kahe PCR-i reaktsiooni vahel ja puhastati enne restriksiooniensüümidega töötlust, *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga vastavalt tootja poolsele juhendile. DNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop-iga, (A_{260 nm}).

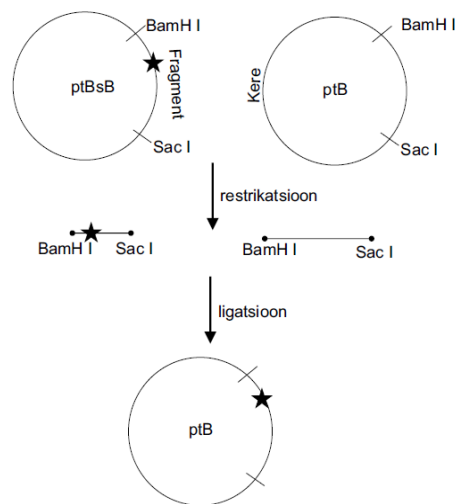
Restriksioon. Soovitud mutatsioone sisaldavaid DNA fragmente ja plasmidi ptBsB restrikteeriti Sac I ensüümiga 1 tund, +37 °C. Restriksioonisegust puhastati puhvri vahetamiseks DNA *FavorGene* protokoll järgi. Puhastatud DNA-d restrikteeriti edasi Sal I-ga, samadel tingimustel nagu eelnevalt. Plasmiidne DNA lahutati agarosgeelelektroforeesil ja puhastati nagu kirjeldatud eelpool.

Ligatsioon. Restriksiooniensüümidega töödeldud PCR-i produktid ligeeriti plasmiidiga. Reaktsioonisegu (20 µl) 1x T4 ligaasi puhvris, mis sisaldas 2 µg plasmidi keret, 2 µg PCR produkti, 25 mM heksamiin-koobalt(III)kloriidi ja 5U T4 ligaasi (*Thermo Scientific*). Ligatsioon kestis 60 min toatemperatuuril.

Plasmiidse DNA transformatsioon bakterirakkudesse. RbCl meetodil kompetentseks muudetud *E. coli* rakususpensioon sulatati jääl ja lisati 10 µl ligatsioonisegu või 10 ng plasmiidset DNA-d ning inkubeeriti 40 min jääl. Peale inkubatsiooni tehti rakkudele kuumašokk 1 min, +42 °C, pärast mida hoiti rakke 3 minutit jääl. Ligatsiooniseguga transformeerimise puhul lisati rakkudele 1 ml 2xYT söödet ja inkubeeriti 1 tund, +37 °C. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel lauatsentrifuugis 3 min (4000 rpm, 4 °C). Rakusademelt eemaldati supenatant. Rakud resuspendeeriti 150 µl 2xYT söötmes ja külvatati LB + Amp (200 µg/ml) tardsöötmele. LB tasse inkubeeriti üle öö, +37 °C.

Plasmiidide kontroll ja puhastamine rakukultuurist. Tassidelt valiti 10 kolooniat, mis suspendeeriti 10 µl MQ vees. Rakkude lüüsimiseks kuumutati rakususpensiooni 5 min, 95°C. Lüüsunud rakkudele lisati 15 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas: 2,5 µl 10x ensüümpuhvrit (750 mM Tris (pH 8,8), 200 mM NH₂SO₄, 0,1% TX-100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin), 1mM MgCl₂, 10 pmol praimereid C2 ja CD1, 0,1 mM dNTP-d, 5U Taq DNA polümeraasi (*TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool*). Esmane DNA denatureerimine toimus 3 min, 94 °C, peale mida toimus PCR reaktsiooni 25 tsüklit järgmistel tingimustel: 30 s, 94 °C; 40 s, 55 °C; 1 min, 73 °C. Peale tsüklite lõppu inkubeeriti reaktsioonisegu täiendavalt 5 min, 72 °C. PCR-i produktid lahutati elektroforeesil 2% agarosgeelis 1xTBE puhvris. Positiivseks osutunud kolooniad (need, kelle on streptavidiini siduvat ligandi) inokuleeriti 2ml 2xYT Amp 100 µg/ml söötmesse ja kasvatati üleöö, +37°C loksutis. Üleöö kultuurist puhastati plasmiidne DNA *FavorPrep Plasmid DNA Extraktion Mini Kit*-i protokoll järgi. Plasmiidide intaktsust kontrolliti vastavalt *AvaI* restriksiooni ja 0,8% agarosgeelelektroforeesil ning 23S rRNA järjestust muteeritud piirkonna sekveneerimise meetoditega.

23S rRNA mutatsiooni viimiseks ptBsB plasmiidist ptB plasmidi, kasutati BamHI-SacI fragmendi viimist plasmiidist ptBsB, plasmidi ptB (joonis 10). Restriksioonid, ligatsioonid ja DNA fragmentide puhastamine toimus nagu kirjeldatud eelnevalt.



Joonis 10. Mutatsiooni sisaldava DNA fragmendi viimine plasmidi ptB. Joonisel on skemaatilisest kujutatud mutatsiooni üleviimine plasmiidist ptBsB plasmidi ptB. Täkniga on tähistatud mutatsiooni koht 23S rRNA geenis. BamHI ja SacI tähistavad restriktatsiooni saite, mille vahele DNA lõik ligeeriti. Tulemuseks on ptB plasmid, milles *rrnB* operon sisaldab muteeritud 23S rRNA-d.

2.2.2 Bakterirakkude generatsioonaja määramine

LB tassilt inokuleeriti kaks kolooniat vedelsöötmesse 2xYT+Amp (100 µg/ml) ja kasvatati üle öö loksutis (180 rpm, +37 °C, INFORS HT Multitron). Üleööökultuurist tehti 20x lahjendus uude 2ml 2xYT söötmesse (Amp 100 µg/ml), ja jätkati kasvatamist 1,5 tundi. Peale 1,5 tundi inkubatsiooni tehti rakukultuurist 10x lahjendus värskesse 2xYT söötmesse Amp 100 µg/ml) ja jätkati kasvatamist veel 1 tunniks. Plasmiidilt kodeeritavate rRNA-de ekpressioon indutseeriti IPTG lisamisega lõppkontsentratsioonis 1mM. OD₆₀₀ mõõdeti iga seitsme minuti järel mikrotiiterplaadilugejas (BMG polarstar) 96 kannuga mikrotiiterplaadilt 150 µl-st rakukultuurist, temperatuuril +37 °C. Generatsioonaja arvutamiseks kasutati valemit (valem 1)

$$G = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 (t_t - t_0)}$$

Valem 1. Valem generatsioonaja arvutamiseks. G – generatsiooniaeg; N_t – eksponentsiaalse faasi lõpppunkt; N₀ – eksponentsiaalse faasi algpunkt; t_t – ajapunkt, mis iseloomustab eksponentsiaalse faasi lõppu ja t₀ – ajapunkt, mis iseloomustab eksponentsiaalse faasi algus.

2.2.3 Rakkude kasvatamine ja lüüs

LB plaadilt külvati 1 bakterikoloonia 2 ml 2xYT söötmesse (Amp 100 µg/ml) ja inkubeeriti loksutis üleöö temperatuuril +37°C. Üleöö kasvanud bakterikultuur külvati ümber 100 ml 2xYT söötmesse, mis sisaldab antibiootikumi Amp (100 µg/ml). Rakukultuur kasvatati tiheduseni 0,1-0,2 (OD₆₀₀), misjärel lisati IPTG (lõppkontsentratsioon 1 mM), et indutseerida plasmiidilt kodeerivate rRNA-de ekpressioon ja bakterikultuuri kasvatamist jätkati 2 tunni. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel 4500 rpm 7 minutit, +4°C (Sorvall RC5B plus, Sorvall GSA rotor) ja kogutud rakud resuspendeeriti 4 ml-s 1xLLP-s (60 mM KCl, 60 mM NH₄Cl, 10 mM Tris HCl pH 8, 12 mM MgOAc, 6 mM β-ME), lisati Dnaas lõppkontsentratsiooniga 25 U/ml ja lüütsüüm lõppkontsentratsiooniga 2 mg/ml. Rakkude lüüsimiseks kasutati homogenisaatorit (Precellys 24) vastavalt tootja protokollile (Garber, 2014). Rakukestade ja klaaskuulide eemaldamiseks rakulüsaadist tsentrifuugiti lüsaati 13000 rpm 18 minutit, +4°C (Heraeus fresco) ja supernantant tõsteti uude reaktsioonituubi.

2.2.4 Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosigradiendist

Ribosoomi partiklid lahutati sahharoosigradiendist ultratsentrifuugimise teel. Selleks valati SW28 tuubidesse gradiendi segaja abil lineaarsed 15% - 40% sahharoosigradiendid. Igale gradiendile kanti 30-50 U (A260) (1000 μ l) rakulüsaati ja tsentrifuugiti ultratsentrifuugis 19700 rpm, ~17 tundi ($\omega^2t=2,8 \times 10^{11}$), temperatuuril +4°C. Gradiendi profiilide visualiseerimiseks kasutati läbivooluspektrofotomeetrit (time constant=2, abs-range=1, $\lambda=254$ nm) (Garber, 2014), peristaatilist pumpa ja isekirjutajat (GE Healthcare). Gradiendist koguti eraldi polüsoomide (tetra-, tri- ja disoom), 70S, 50S ja 30S ribosomaalsete partiklite fraktsioonid.

2.2.5 Ribosomaalsete subühikute sadestamine

Ribosomaalsete partiklite sadestamiseks lisati kogutud gradiendifraktsioonidele 2,5x mahtu etanooli ja 0,3M lõppkonsentratsioonis NaOAc pH 5,5 ning inkubeeriti temperatuuril -20°C üleöö. Partiklid sadestati tsentrifuugimise teel 1 tund 4500 rpm (Rotina 420R) (Garber, 2014). Ribosoomi sademelt eemaldati supernatant ja sadet kuivatati temperatuuril +37°C, 10 minutit. Ribosoomid lahustati 1xLLP-s ja rRNA konsentratsioon määrati NanoDrop-i spektrofotomeetriga (A260). Ribosomaalsed partiklid säilitati temperatuuril -85°C.

2.2.6 rRNA puhastamine ribosomaalsetest partiklitest

3U (A260) ribosoomi lahuse lõppruumala viidi 200 μ l-ni 1xLLP-ga. rRNA ekstraheerimiseks lisati lahusele 800 μ l puhvrit PM (Quiagen) ja segati väristajal 20 minutit toatemperatuuril. rRNA sidumiseks lisati segule 15 μ l 50%-list Räni suspensiooni ja jätkati väristajal 10 minutit toatemperatuuril. Räni sadestati lauatsentrifuugis 13000 rpm 1 minut, +4°C ja eemaldati supernatant. Sadet pesti 2 korda 70% etanooliga ja kuivatati 10 minutit temperatuuril +37 °C (Garber, 2014). RNA elueeriti räni küljest 20 μ l (polüsoomid ja 30S) või 50 μ l (70S, 50S) MQ veega temperatuuril +37 °C, 3 minutit. Räni sadestati lauatsentrifuugis 13000 rpm, 3 minutit ja rRNA vesilahus viidi uude reaktsioonituubi. RNA konsentratsioon lahuses määrati spektrofotomeetriga (NanoDrop) A260.

2.2.7 Praimeri kineerimine

Minisekveneerimisreaktsiooni jaoks vajalik praimer kineeriti juhendaja poolt. Reaktsiooniks võeti 112 pmol mini TAG oligonukleotiidi, 10 µl $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (Hartmann Analytic), 5 µl 10x PNK puhver, PNK 20U (*MBI Fermentas*) ja reaktsioonisegu viidi MQ veega 50 µl-ni. Seejärel inkubeeriti reaktsioonisegu 1,5 tundi, +37 °C ja puhastati *Qiagen Nucleotide removal Kit*-i protokoll järgi. Kineeritud praimer elueeriti kolonnilt 50 µl MQ veega.

2.2.8 Minisekveneerimine

Praimeriekstentsiooniks võeti 2 pmol rRNA-d, lisati 2 µl hübrisatsiooni puhvrit (HB) (225 mM K-HEPES pH7, 450 mM KCl) ja 1 pmol kineeritud praimerit. Reaktsiooni lõpprumala viidi MQ-ga 10 µl-ni. RNA denatureerimiseks ja praimetite seondumiseks RNA-le kuumutati reaktsioonisegu +90°C, 1 minut ja jahutati aeglaselt temperatuurini +37°C. Reaktsioonisegud tõsteti peale jahutamist jääle ja jagati võrdselt kahe reaktsioonituubi vahel (A ja G) ja lisati 2 µl 10x RT-RB (500 mM Tris-HCl (pH 8,3), 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂), 3U AMV pöördtranskriptaasi ja reaktsioonisegu maht viidi 9 µl-ni. Mõlemale reaktsioonisegule lisati vastavalt 1 µl ddA segu (125 mM dNTP (välja arvatud dATP) ja 0,25 mM ddATP) või 1 µl ddG segu (125 mM dNTP (välja arvatud dGTP) ja 0,25 mM ddGTP). Reaktsioonisegu inkubeeriti 30 minutit, +42°C, misjärel peatati reaktsiooni 120 µl RT-STOP-i lahusega (1 osa 300 mM NaOAc ja 3 osa 96% etanooli). Nukleiinhape sadestati -20°C üleöö. ja tsentrifuugimise teel 13000 rpm 15 minutit, +4°C. Sademelt eemaldati supernatant, kuivatati 10 minutit +37°C ja sade lahustati 10 µl formamiidi STOP-is (FS) (80 % deioniseeritud formamiid 10 mM EDTA, 0,25% broomfenool sinine) proove denatureeriti +90°C, 5 minutit. Fragmentide lahutamiseks kanti 2 µl praimerekstentsioonil saadud materjali 10% UUREA-PAA geelile (1xTBE, 8M UUREA, 10% akrüülamiid-bis-akrüülamiid (19:1)) ja elektroforeesiti pingega 2000V. DNA fragmendid visualiseeriti phosphoimageriga (Typhoon trio) ja analüüsiti ImageQuant programmiga. Streptavidiini siduvat ligandi abil on võimalik tuvastada nii metsiktüübi kui ka mutatsioonide variante bändide intensiivsuse ja võrrelda saadud tulemusi. Tulemused näitavad palju on mutatsiooniga ptBsB plasmiidilt kodeerivat 23S rRNA-d ribosoomi fraktsioonis.

2.3 Tulemused

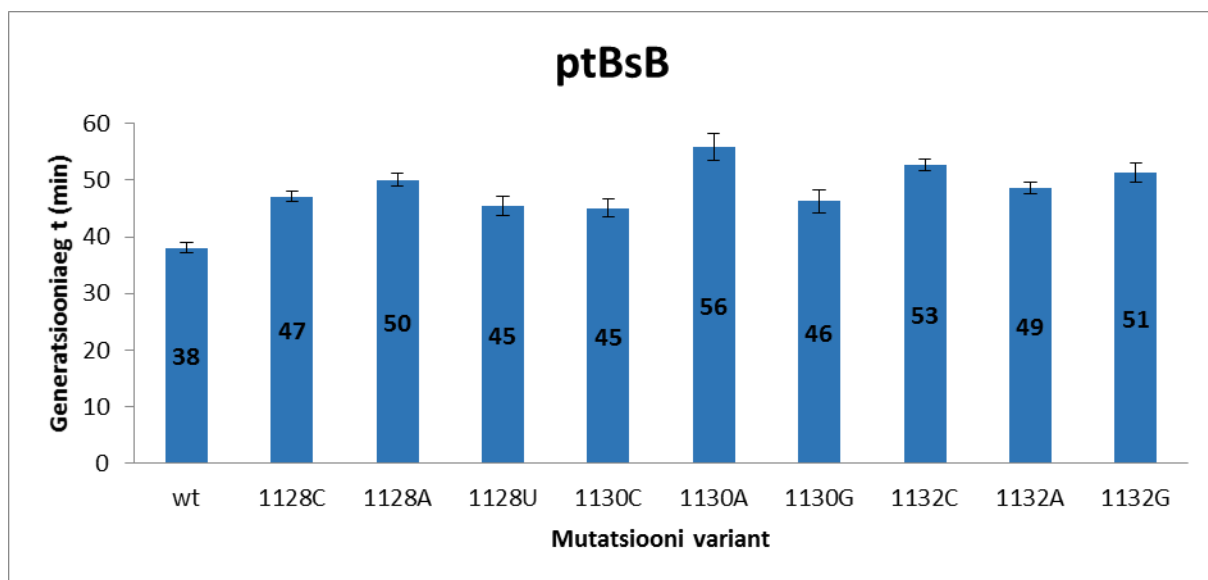
2.3.1 Mutantseid 23S rRNA variante sisaldavate plasmiididekonstrueerimine

Hüpoteesi, mille järgi muutused 23S rRNA 1130 piirkonnas võivad põhjustada 50S ribosomaalse subühiku assambleerimis defekti, kontrollimiseks kloneeriti ptBsB ja ptB plasmiididesse 23S rRNA geenid, mis sisaldasid punktmutatsioone G1128C, G1128A, G1128U, U1130C, U1130A, U1130G, U1132C, U1132A ja U1132G. Punktmutatsioonide genereerimiseks kasutati suunatud mutageneesi nagu kirjeldatud meetodite osas. 23S rRNA sisaldas lisaks genereeritud mutatsioonile ka afiinsuspuhastamiseks vajalikku streptavidiini siduvat ligandi 23S rRNA heeliksis 25, mis võimaldab vajadusel soovitud punktmutatsiooni sisadavad 50S subühikud ribosoomide segapopulatsioonist välja puhastada. Konstrueeritud plasmiidide intaktsust analüüsiti Ava I restriksiooniga. Plasmiidide järjestused kontrolliti sekveneerimisega.

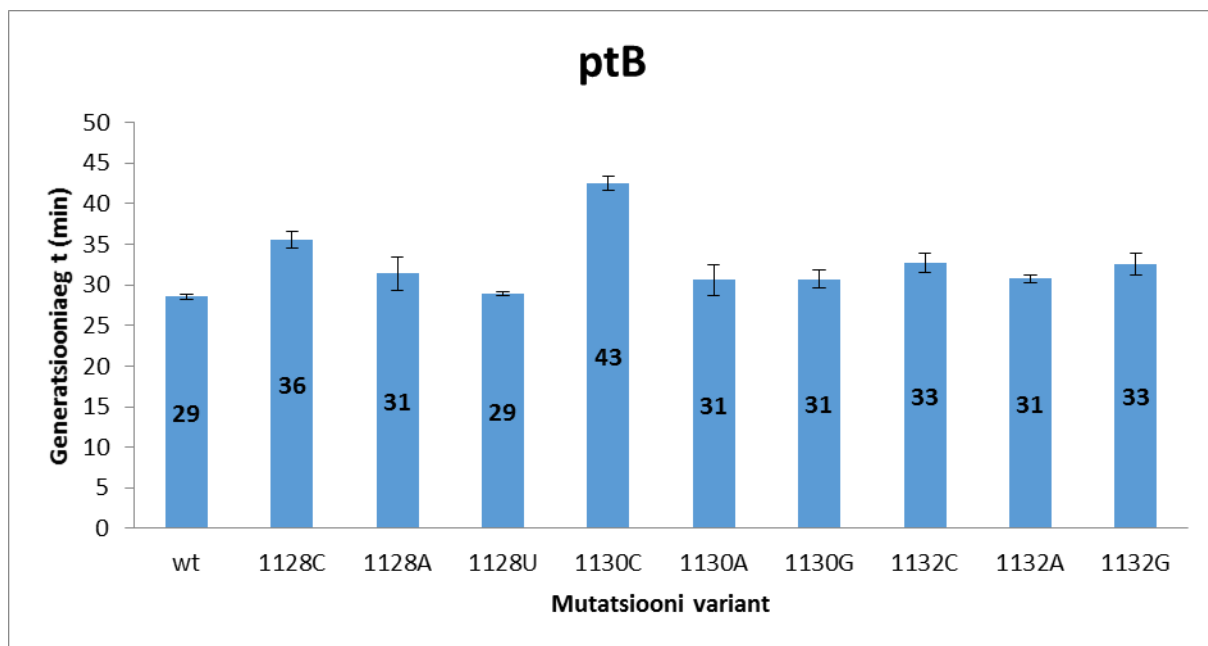
Lisaks konstrueeriti ptBsB plasmiid, mis sisaldas 23S rRNA varianti kus lisaks analüüsitavale punktmutatsioonile oli lisatud teine mutatsioon positsioonis A1067T mis asub samuti 23S rRNA domeenis II. Selles konstruktis puudus streptavidini siduvat ligand.

2.3.2 23S rRNA 1130 regiooni mutatsioonide mõju rakkude kasvufenotüübile

Mutatsioonide mõju hindamiseks kasvufenotüübile, ekspresseeriti punktmutatsiooni sisaldavat 23S rRNA-d *E. coli* XL-1 blue või M15 rakkudes. Kontrolliks ekspresseeriti 23S rRNA-d, mis ei sisaldanud 1130 piirkonna mutatsioone, kuid sisaldas streptavidiini siduva ligandi järjestust. OD₆₀₀ mõõdeti 7-minutilise intervaliga ja generatsiooniaeg arvutati nagu kirjeldatud meetodites. Generatsiooniaeg oli määratletud kui ajavahemik, mille jooksul bakterikultuuri tihedus kahekordistub. Saadud tulemused on toodud tulpdiagrammina joonisel 11 ja 12. Joonisel 11 on näha, et XL-1 rakkude, kus ekspresseeritakse wt 23S rRNA-d, generatsiooniaeg on 38 minutit ja kõikide mutantsete rRNAde ekspresseerimine toob kaasa 1,2 kuni 1,5 kordse generatsiooniaegade tõusu. Sellest võib järeldada, et kõigi käesolevas töös konstrueeritud 23S rRNA varaintide ekspresseerimine mõjub rakkude elutegevusele inhibeerivalt. Kõige suuremat kasvufenotüüpi näitavad üles rakud, milles ekspresseeriti U1130A ja U1132C mutatsiooni kandvaid 23S rRNA-sid (joonis 11). 23S rRNA mutatsioon U1130A põhjustab suuremate rakukultuuride lahjenduste puhul rakkude jagunemise lakkamise ja rakkude surma (tulemused näitamata), mis viitab tõsistele probleemidele valgusünteesis. Mutantsete 23S rRNA-de ekspresseerimine ptB plasmiidilt M15 rakkudes omab võrreldes ptBsB-ga tagasihoidlikumat efekti, põhjustades 1 kuni 1,2 kordset generatsiooniaegade tõusu (joonis 12). Ainus erand on mutatsioon U1130C, mille puhul pikeneb generatsiooniaeg 1,5 korda (joonis 12). Tulemused näitavad, et 23S rRNA 1130 piirkonna mutatsioonid omavad efekti rakkude kasvule.



Joonis 11. Mutatsiooni kandva 23S rRNA ekspresseerimise plasmiidilt ptBsB, mõju *E.coli* tüve XL-1 kasvule. Joonisel on tulpdiagramm kus on näidatud *E.coli* rakkude generatsiooniajad, milles ekspresseeriti ptBsB plasmiidilt 23S rRNA variante, mis sisaldasid mutatsioone 1130 regioonis. Joonisel on näidatud veapiirid 3 katse põhjal.



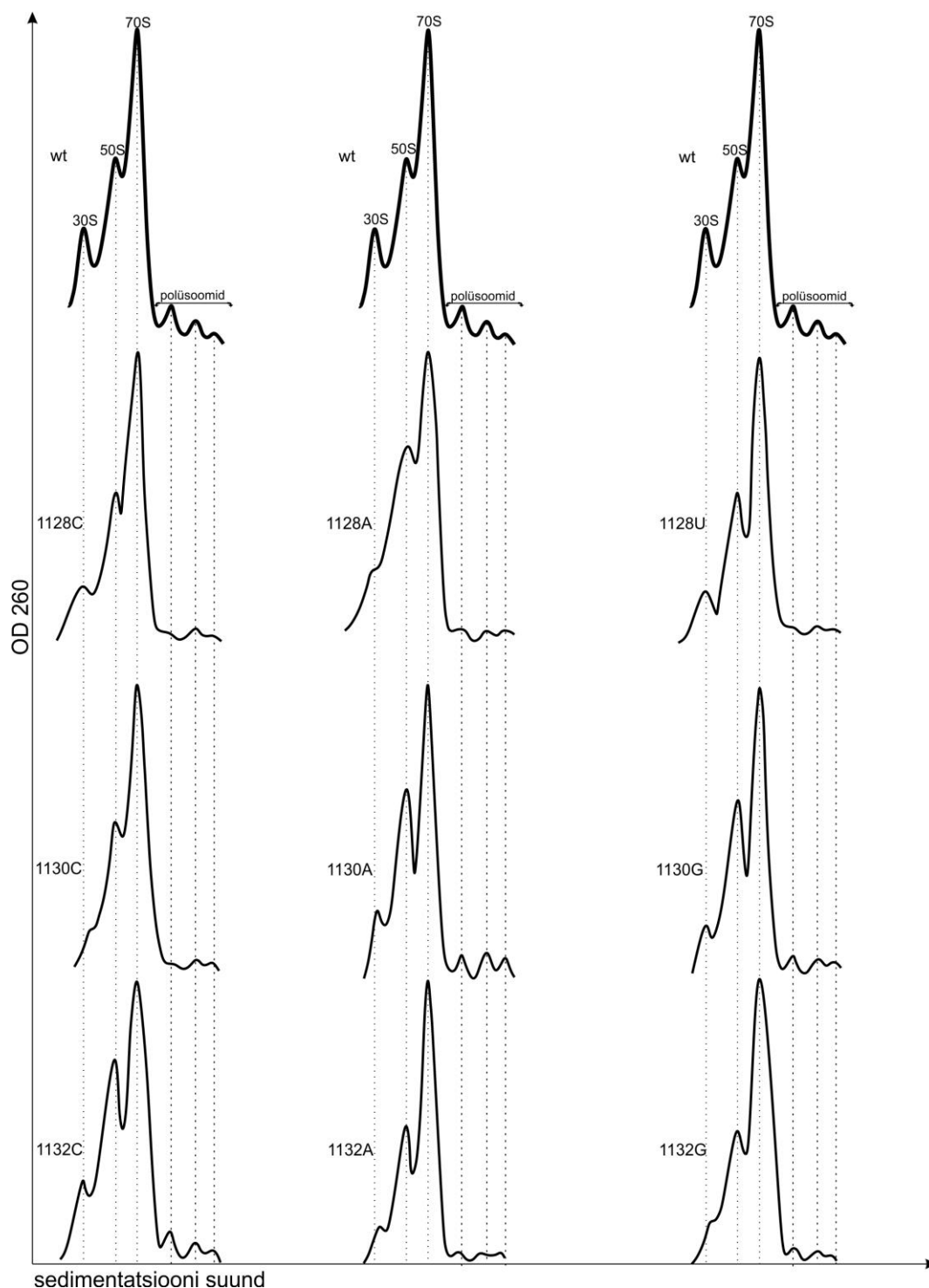
Joonis 12. Mutatsiooni kandva 23S rRNA ekspresseerimise plasmiidilt ptB, mõju *E. coli* tüve M15 kasvule. Joonisel on tulpdiagramm, kus on näidatud *E. coli* rakkude generatsiooniajad, milles ekspresseeriti ptBsB plasmiidilt 23S rRNA variante, mis sisaldasid mutatsioone 1130 regioonis. Joonisel on näidatud veapiirid 3 katse põhjal.

2.3.3 23S rRNA 1130 piirkonna mutatsioonide mõju ribosoomiprofiilidele

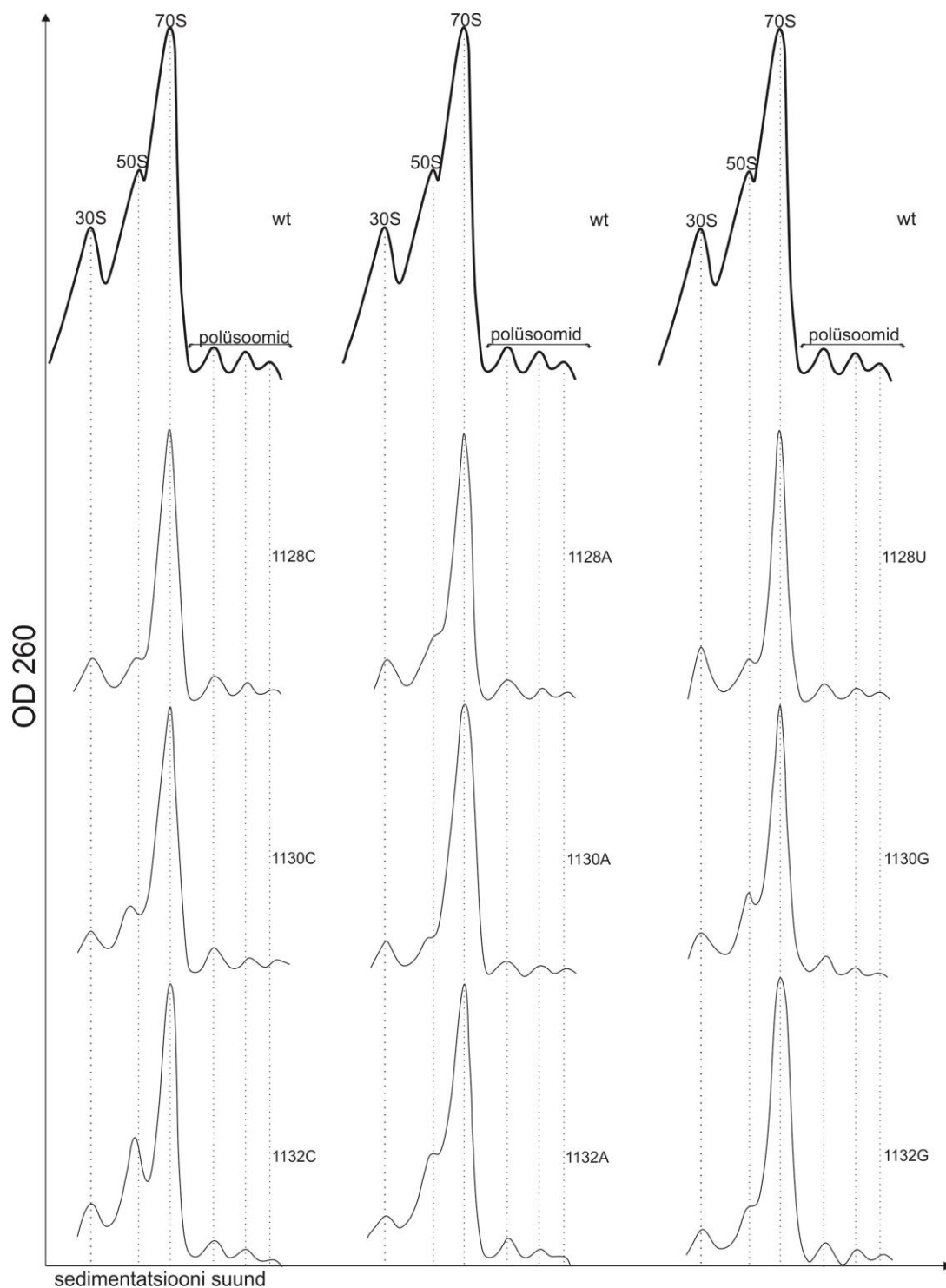
Ribosoomiprofiilide analüüsimiseks ekspresseeriti 23S rRNA variante *E. coli* XL-1 blue või M15 rakkudes plasmiididelt ptBsB või ptB. Rakke kasvatati ja lüüsi ning 40U lüsaati tsentrifuugiti läbi sahharoosigradiendi, nagu kirjeldatud meetodite osas. Kontrolliks kasutati plasmidi, millelt ekspresseeriti wt 23S rRNA-d, mis sisaldas streptavidiini siduvat ligandi (joonis 13). Joonisel 13 on näha, et 23S rRNA variantide U1130A, U1130G, U1132C ekspressioon plasmiidilt ptBsB põhjustab vabade 50S subühikute piigi olulist suurenemist (joonis 13 rida 3 ja 4). Antud tulemus viitab, et need mutatsioonid põhjustavad 50S assambleerumise defekte, kuna 50S ei ole võimeline moodustama 70S ribosoomi. Lisaks on näha, et polüsoomide piigid on oluliselt vähenenud, eriti 23S rRNA variantide G1128U, U1130C ja U1132A puhul (joonis 13 rida 2, 3 ja 4). Polüsoomide vähenemine on märk sellest, et rakkudes on vähenenud valgusünteesi tase.

Joonisel 14 on näha, et 23S rRNA variantide G1128C, G1128U, U1130A ekspressioon plasmiidilt ptB M15 rakkudes põhjustab 50S ribosoomide fraktsiooni drastilist vähenemist sahharoosigradiendites. Joonisel 14 on näha, et 23S rRNA variante ekspresseerimisel vaid U1132C 50S piik on veidi suurenenud võrreldes metsiktüübiga. Polüsoomide fraktsioonid on sarnased kontroll profiilidega (joonis 14), mis lubab eeldada, et translatsioon toimub aktiivselt ja fenotüübiline efekt on tagasihoidlikum võrreldes 23S rRNA variantide ekspressiooniga ptBsB plasmiidilt XL-1 tüves (joonis 13).

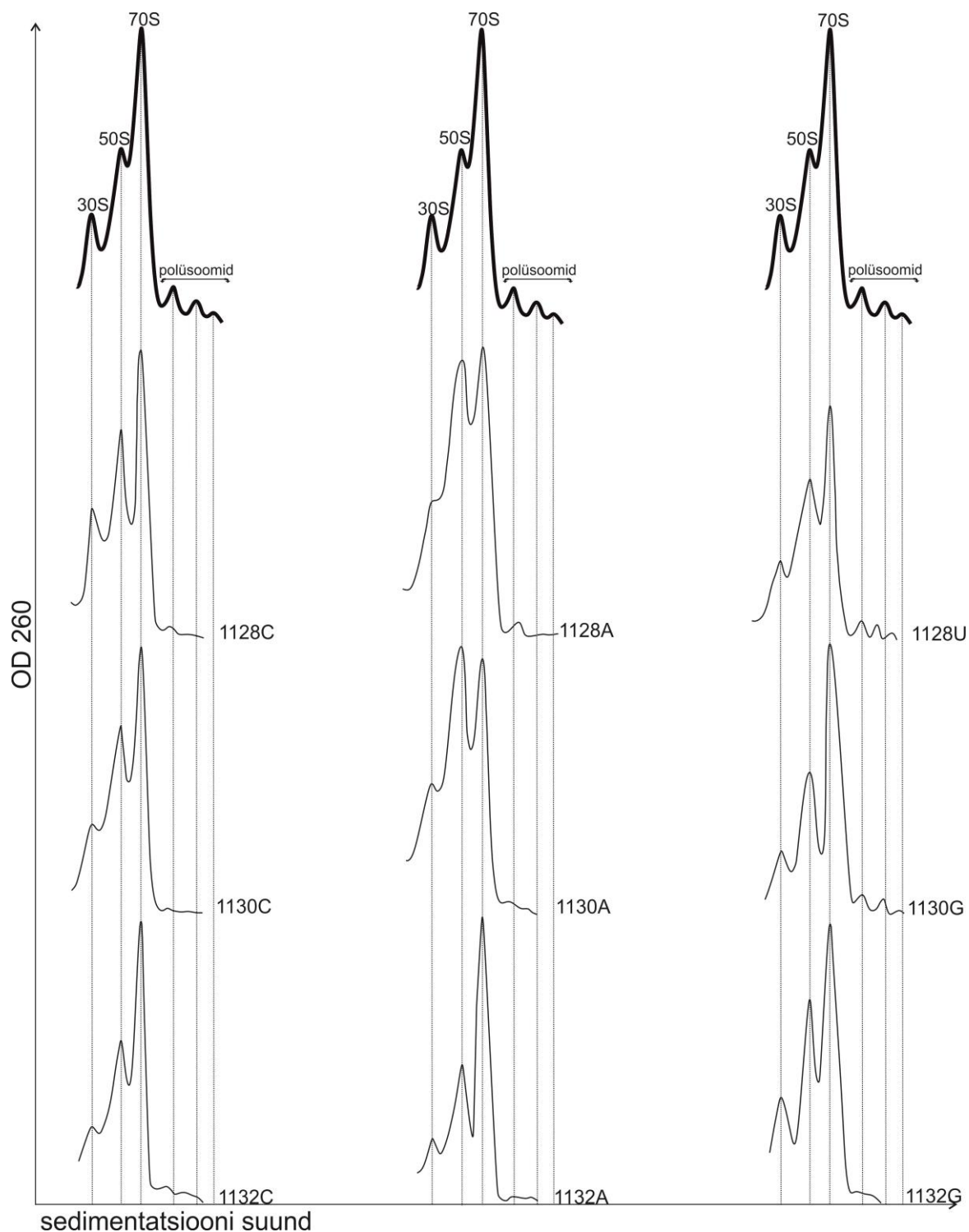
Analüüsimiseks, kas mitme mutatsiooni tekkimine ühes 23S rRNA domeenis põhjustab kumulatiivset fenotüübilist efekti, analüüsiti ka 23S rRNA, mis sisaldab lisaks eelpool käsitletud mutatsioonidele tiostreptooni resistentsus mutatsiooni A1067T 23S rRNA II domeenis, ekspressioonist tingitud efekti sahharoosigradiendi profiile. Joonisel 15 on näha, et enamikel mutantidel on märkimisväärne erinevus võrreldes metsiktüübiga (joonis 15). Polüsoomide fraktsioonid viitavad, et kõikidel 23S rRNA variantidel, välja arvatud G1128U ja U1130G (joonis 15 rida 2 ja 3), on translatsiooni tase vähenenud. Märkimisväärse 50S fraktsiooni suurenemist on näha 23S rRNA variantidel G1128A ja U1130A, mis viitab suurele defektile 50S assambleerimises, kuna 50S ei ole võimeline moodustama funktsionaalse 70S ribosoomi.



Joonis 13. XL-1 rakkude ribosoomiprofiilid. 23S rRNA variante ekspresseeriti plasmiidilt ptBsB. Ribosoomipartiklid lahutatud lineaarses 15%-40% sahharoosigradiendis. Vertikaalsed katkendjooned tähistavad ribosomaalsete partiklite (30S, 50S, 70S ja polüsoomid) asukohti. Esimeses reas on tumeda joonega näidatud wt ribosoomiprofiil (rida 1). Teises reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis G1128 (C, A ja U). Kolmandas reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis U1130 (C, A ja G). Neljandas reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis U1132 (C, A ja G).



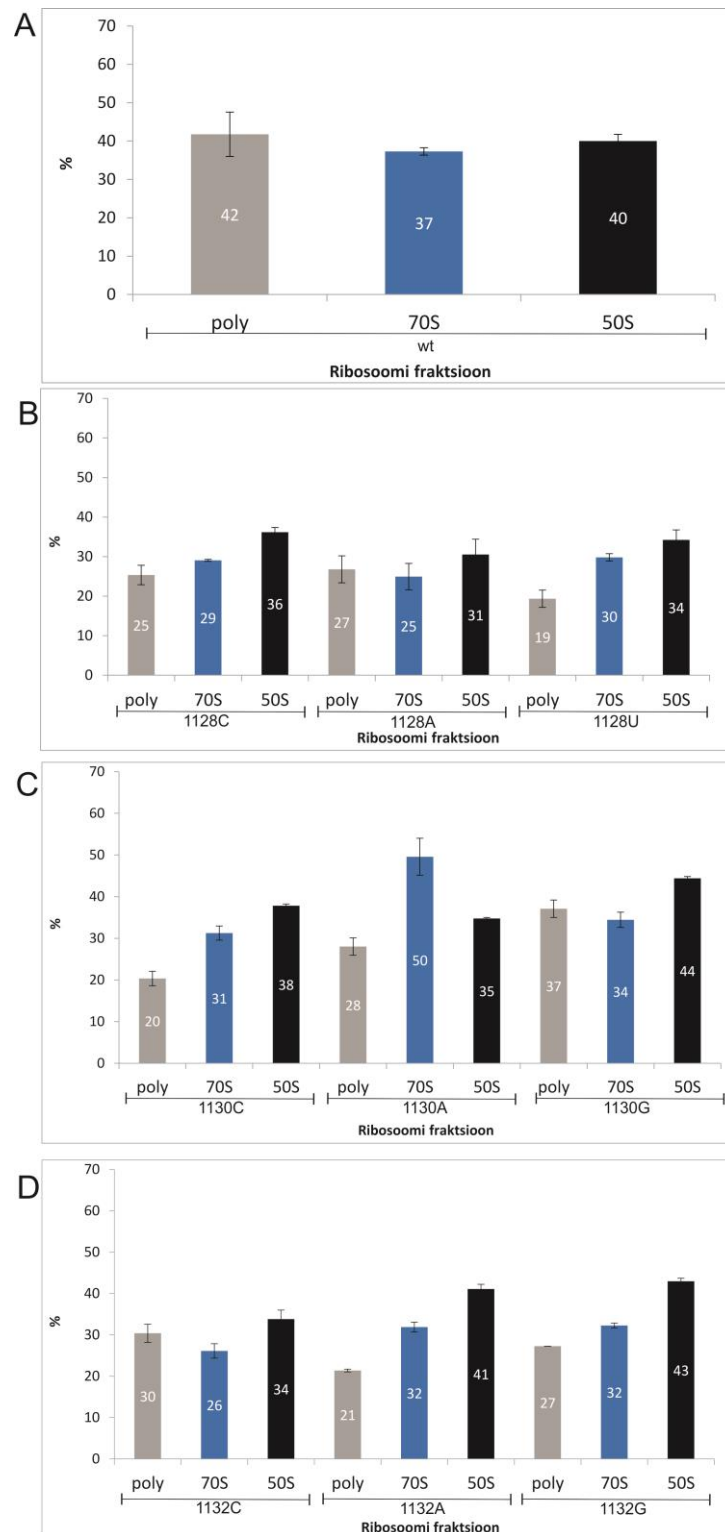
Joonis 14. M15 rakkude ribosoomiprofiilid. 23S rRNA variante ekspresseeriti plasmiidilt ptB. Ribosoomipartiklid on lahutatud lineaarses 15%-40% sahharoosigradiendis. Vertikaalsed katkendjooned tähistavad ribosomaalsete partiklite (30S, 50S, 70S ja polüsoomid) asukohti. Esimeses reas on tumeda joonega näidatud wt ribosoomiprofiil (rida 1). Teises reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis G1128 (C, A ja U). Kolmandas reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis U1130 (C, A ja G). Neljandas reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis U1132 (C, A ja G).



Joonis 15. M15 rakkude ribosoomiprofiilid. 23S rRNA variante koos lisa mutatsiooniga A1067T ekspresseeriti plasmiidilt ptBsB. Ribosoomipartiklid lahutatud lineaarses 15%-40% sahharoosigradiendis. Vertikaalsed katkendjooned tähistavad ribosomaalsete partiklite (30S, 50S, 70S ja polüsoomid) asukohti. Esimeses reas on tumeda jooneganäidatud wt ribosoomiprofiil (rida 1). Teises reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis G1128 (C, A ja U). Kolmandas reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis U1130 (C, A ja G). Neljandas reas on 23S rRNA variandid, mis kannavad mutatsioone positsioonis U1132 (C, A ja G).

2.3.4 Plasmiidilt ekspresseeritud 23S rRNA jaotus ribosomaalsetes fraktsioonides.

E. coli rakkudes XL-1 blue ekspresseeriti G1128C, G1128A, G1128U, U1130C, U1130A, U1130G, U1132C, U1132A, U1132G 23S rRNA variante, et tuvastada, kui palju plasmiidiselt DNA-lt ekspresseeritud 23S rRNA-d sisaldavad erinevad ribosoomide populatsioonid. Sahharoosigradiendist koguti eraldi ribosoomide fraktsioonid 70S, 50S ja polüsoomid 23S rRNA analüüsimiseks kasutati praimerit mini TAG pikendamise reaktsiooni, mis võimaldas järjestuse erinevuse järgi tuvastada streptavidiini ligandi järjestuse mutatsiooni kandvates 23S rRNA-des. Saadud tulemused võrreldati kontrolli vastu ja saadud tulemused on toodud tulpdigrammina joonisel 16 koos veapiiriga. Joonisel on näha, et G1128C, G1128A, G1128U, U1130C, U1132A ja U1132G (joonis 16 B, C ja D), et 50S-is on mutatsiooniga 23S rRNA hulka on rohkem ja see arv on suurenenud umbes 1,5 korda polüsoomide fraktsioonist. See võib tähendada, et 50S-i assambleerimine on defektne, mis võib põhjustada subühikute interaktsiooni jooksul translatsiooni defekte. G1128A, U1132C mutantidel on 50S-is suurem arv, aga mitte nii palju kui teistel (joonis 16 B ja D). Märkimisväärne tulemus on saadud U1130C-s, kus 70S fraktsioonis 23S rRNA hulk on väga suur.



Joonis 16. Plasmiidilt ekspresseeritud 23S rRNA jaotus ribosomaalsetes fraktsioonides. 23S rRNA-sid ekspresseeriti plasmiidilt ptBsB-t *E. coli* XL-1 blue rakkudes. Plasmiidilt kodeeriva 23S rRNA hulk ribosoomifraktsioonides määrati praimeriektensiooniga. A: wt tüve. B, C ja D paneelis on 1128, 1130 ja 1132 positsioonide punktmutatsioonide variante. Hall tulp tähistab polüsoomide (poly) fraktsiooni, tumesinine tulp 70S fraktsiooni ja must 50S fraktsiooni. Joonisele on märgitud katse sisesed veapiirid.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada 23S rRNA domeeni II 1130 regiooni suunatud mutageneesi abil. 1130 regioon on huvi pakkuv piirkond. 1130 piirkonna lähedal on GTPaasi tsenter ja „U-pööre“ (Baranov jt., 1998), kus mutatsioonid võivad põhjustada ribosomaalse aktiivsuse vähenemist. 1130 piirkond asub tertsiaarstruktuuri PTC tsentri lähedal (Petrov jt., 2013), mille mutatsioonid võivad põhjustada vigu peptiidsideme moodustamisel.

Joonisel 11 näidatud tulemused viitavad, et mutatsioone kandva 23S rRNA ekspresseerimine plasmiidilt ptBsB mõjutab *E. coli* tüve XL-1 kasvu, kuna mutatsiooni kandvate 23S rRNA variantide ekspressioonist tingitud generatsiooniaeg erineb metsiktüübist. Märkimisväärne erinevus on 23S rRNA variandis U1130A (joonis 11). Lisaks põhjustab U1130A mõnikord suuremate rakukultuuride lahjenduste puhul rakkude jagunemise lakkamist ja rakkude surma, mis viitab tõsistele probleemidele valgusünteesis. Vaadates 23S rRNA variante G1128A ja U1130A, on näha, et generatsiooniaeg on pikem, võrreldes teiste samas positsioonis olevate 23S rRNA variantidega (G1128C, G1128U, U1130C ja U1130G), generatsiooniaja erinevus on umbes 7 minutit (joonis 11). See võimaldab spekuloida, et A nukleotiid põhjustab positsioones 1128 ja 1130 suuremat defekti rakkude kasvule. 23S rRNA variandid U1132C, U1132A ja U1132G põhjustavad raku kasvudefekte, generatsiooniaeg on umbes 50 minutit, mis on 1,3 korda pikem kui metsiktüübil, mis pooldub iga 38 minuti järel. Saadud tulemused lubavad järeltada, et punktmutatsioonid 1130 regioonis mõjutavad kasvufenotüüpi.

Mutatsioone kandva 23S rRNA ekspresseerimine plasmiidilt ptB mõjutab *E. coli* tüve M15 kasvu (Joonis 12), kuna mutatsioonide variantide generatsiooniaeg erineb metsiktüübist (joonis 11 ja 12). Erinevus võib olla selles, et plasmiidiga on 23S rRNA variantide G1128C ja U1130C generatsiooniajad on 1,2 ja 1,5 korda pikemad, kui metsiktüübil. Põhjuseks võib olla see, et rakul on raske kasvada (joonis 12). Kõikide mutantide kasvukiirus on vähenenud, mis võimaldab spekuloida, et selle regiooni mutatsioonid põhjustavad ribosomaalse aktiivsuse defekti.

Ribosoomiprofiilide analüüsimiseks ekspresseeriti 23S rRNA variante *E. coli* XL-1 või M15 rakkudes plasmiididelt ptBsB või ptB. ptBsB plasmiidilt kodeeritavate erinevate punktmutatsioonidega 23S rRNA mõju ribosoomidele on toodud joonisel 13.

Gradiendiprofiilis on näha, et 50S subühiku pindala on suurenenud võrreldes metsiktüübi 50S subühiku pindalga (joonis 13 rida 2, 3 ja 4), eriti, U1130A, U1130G ja U1132C 23S rRNA variantides. Põhjuseks võib olla see, et mutatsiooni sisaldav 23S rRNA pannakse valesti kokku, põhjustades sellega kõrvalekaldeid normaalsest ribosoomi assambleerimise rajast. Kuna ribosoomi assambleerimise protsess järgib kindlat rada (Dohme ja Nierhaus, 1976), võib eeldada, et kui varajases assambleerimise faasis toimub viga, siis edasine assambleerimise protsess läheb samuti valesti. Need tulemused on heas korrelatsioonis kasvufenotüübi tulemusega, kus 23S rRNA variantide U1130A, U1130G ja U1132C generatsiooniaeg on umbes 10 minutit tõusnud. Huvitav on see, et U1130A, U1130G ja U1132C 23S rRNA variantidel on polüsoomide profiil nagu metsiktüübis, mis tähendab, et translatsioon on aktiivne. Kui vaadata polüsoomide profile, siis on näha, et G1128C, G1128A, G1128U, U1130C, U1132A ja U1132G polüsoomide fraktsioonid on oluliselt vähenenud (joonis 13 rida 2, 3 ja 4). Polüsoomid on ribosoomi kompleksid, mis on seotud ühe mRNA molekuliga. Polüsoomide suurus on korrelatsioonis translatsiooni aktiivsusega, mis tähendab, et kui polüsoomide fraktsioonid on suured, siis translatsioon on aktiivne (Zouridis ja Hatzimanikatis, 2007). Nende andmete põhjal spekulatsioon, et nendel mutantidel ei toimu aktiivset valgusünteesi.

ptB plasmiidilt kodeeritavate erinevate punktmutatsioonidega 23S rRNA mõju ribosoomidele on toodud joonisel 14. Kui vaadata ribosoomi fraktsioonide pindalasid, on näha, et 50S subühiku fraktsioon on suurem võrreldes metsiktüübi 50S subühiku pindalaga, ainult 23S rRNA variandis U1132C (joonis 14 rida 4). Põhjuseks võib olla 50S subühiku assambleerumise defekt. Enamasti kõikidel mutantidel on ribosoomide fraktsioonide piigid samal kohal nagu metsiktüübis ja nende ribosoomide fraktsioonid ei ole nihkunud ega suurenenud. Polüsoomide profiilist võib järeldada, et translatsioon on aktiivne võrreldes ptBsB plasmiidilt kodeeriva 23S rRNA variantide G1128C, G1128A, G1128U, U1130C, U1132A ja U1132G (joonis 13 rida 2, 3 ja 4) polüsoomide profiilidega ja võrreldes metsiktüübiga. Plasmiidilt ekspresseeritud 23S rRNA jaotust ribosomaalsetes fraktsioonides kontrolliti praimeriekstensiooniga ja saadud tulemused viitavad sellele, et mutatsiooniga 23S rRNA-d ribosoomi fraktsioonis on väga vähe (tulemused näitamata).

Lisaks 1130 piirkonna punktmutatsioonidele lisati ptBsB plasmiidilt kodeeriva 23S rRNA variandile lisa mutatsioon A1067T, mida ekspresseeriti M15 tüves. Sahharoosigradient näitas (joonis 15), et suurim defekt 50S assambleerimisele on 23S rRNA variantidel G1128A

ja U1130A (joonis 15 rida 2 ja 3), mille 50S on sama või kõrgem kui 70S piik, mis viitab sellele, et assambleerimise protsessis on tõsised vead, ja sellepärast ei saa moodustuda funktsionaalne 70S. Ülejaanud 23S rRNA variandid näitavad ka defekte, kuna ribosoomi fraktsioonide piigid erinesid metsiktüübi ribosoomi piigist. Polüsoomide fraktsioonid puuduvad, kui võrrelda metsiktüübiga polüsoomide fraktsioonidega, mis võib näita, et translatsioon ei ole aktiivne. Need tulemused näitavad, et valgusünteesi tase on ülimadal, võrreldes ptBsB plasmiidilt kodeeriva 23S rRNA variantide sahharoosigradientidega (joonis 13), kus polüsoomide fraktsioonid on vähenenud, aga mitte puudu.

Saadud andmed lubavad järeldada, et kõik 23S rRNA 1130 piirkonna variandid mõjutavad ribosoomi, kuna on näha, et sahharoosigradiendi profiilid erinevad metsiktüübist. Nii ptBsB kui ptB plasmiidilt kodeeritava 23S rRNA variandid kui ka 23S rRNA variandid milles on lisa mutatsioon A1067T, põhjustavad probleeme ribosoomis ja translatsiooni aktiivsuses. Enamasti kõikidel mutantidel esineb 50S subühiku assambleerumise defekte ja kui 50S assambleerumise protsess juba algusest on valesti läinud, siis see mõjutab edasi translatsiooni. Lisaks on teada, et 50S tsentraalse kühmu moodustamisest võtavad osa 23S rRNA nii II kui ka V domeenid, r-valgud ja 5S rRNA (Gao jt., 2003; Zhao jt., 2004). Selle informatsiooni põhjal oletan, et punktmutatsioonid 23S rRNA domeeni II 1130 piirkonnas võivad põhjustada vigu domeenide II ja V interaktsioonides, mis viivad selleni, et funktsionaalne 50S ei saa moodustuda, eriti kui domeenis II esineb kaks mutatsiooni korraga (joonis 15).

Jooniselt 16 on näha, et polüsoomides on vähe mutatsiooni sisaldavat 23S rRNA-d, 70S fraktsioonis on samamoodi. Aga 23S rRNA variandis U1130A 70S fraktsioonis on palju mutatsiooniga 23S rRNA-d. Põhjused, miks U1130A mutatsiooni sisaldav rRNA varaint akumulereb ribosomaalses 70S fraktsioonis ei ole praegu selge (joonis 13 rida 3). 23S rRNA variantides G1128C, G1128U, U1130C, U1132A ja U1132G 23S rRNA-d on rohkem seal, kus esineb suurem 50S subühiku assambleerimise defekt. See tähendab, et kui vaadata polüsoomide ja 70S fraktsioone ja võrrelda saadud katsest mutatsiooniga 23S rRNA hulka 50S fraktsioonis, on näha, et mutatsiooniga 23S rRNA-d on 50S subühikus rohkem kui polüsoomides ja 70S fraktsioonis. Mutatsiooniga 23S rRNA jaotus metsiktüübis ja mutantidel on erinev. Võrreldes metsiktüübiga, kus 23S rRNA hulk on ühtlane (joonis 16 A), mutantidel on jaotus ebaühtlane. Mutatsioonide variantide 23S rRNA hulk ei ole ühtlaselt jaotunud, erinevus on 1,2 kuni 1,9 korda suurem 50S fraktsioonides võrrelduna polüsoomidega. Need

tulemused on korrelatsioonis sahharoosigradiendi tulemustega, kui on suurem assambleerumise defekt 50S subühikus, siis on 50S subühiku fraktsioonis suurem hulk mutatsiooniga 23S rRNA-d. Nende tulemuste põhjal oletan, et 50S subühikus esineb assambleerimise defekt.

Võttes kokku antud töös kogutud andmed järeldan, et 23S rRNA 1130 piirkonna punktmutatsioonid mängivad rolli 50S subühiku assambleerimisel ja translatsioonis. Analüüsitud 23S rRNA variandid põhjustavad defekte ribosoomis, mis põhjustavad hiljem probleemid translatsioonis.

Kokkuvõte

E. coli 23S rRNA 1130 piirkond, mis asub domeenis II, on väga huvitav uurimisobjekt. See on huvi pakkuv piirkond, sest 50S subühiku tsentraalne kühm sisaldab rRNA-d, r-valku ja lisaks veel domeeni II ja V. Lisaks domeeni II on tugevas interaktsioonis domeeniga V, kus asub PTC (Gao jt., 2003; Zhao jt., 2004). 23S rRNA II domeeni piirkond 1130 on GTPaasse tsentri lähedal (Li jt., 2006). Spekuleerin, et mutatsioonid selles piirkonnas põhjustavad ribosomaalse aktiivsuse vähenemist. Käesoleva töö raames püüti välja selgitada, kasutades suunatud mutageneesi, kas 1130 piirkond mõjutab ribosoomi biogeneesi.

Antud töö tulemuste järgi võib teha järgmised järeldused:

1. Kasvufenotüübi analüüs näitas, et rakud ei kasva sama kiirusega nagu metsiktüüp. ptBsB plasmiidilt kodeeritud 23S rRNA variantide ekspressioon põhjustab suuremat generatsiooniaja defekti kui ptB plasmiidilt kodeeritud 23S rRNA variandid. Eriti mutatsiooni variant U1130A, mis on suuremates rakukultuure lahjendusel eluvõimetu.
2. Ribosoomide analüüs sahharoosigradiendis kinnitas kasvufenotüübili tulemusi. ptBsB plasmiidilt kodeeritava 23S rRNA erinevad variandid näitasid suurema defekti võrreldes ptB plasmiidiga. 50S subühiku assambleerimine on häirinud (eriti U1130A, U1130G ja U1132C mutatsioonide variantidel ptBsB plasmiidilt ja U1132C mutatsiooni variandis ptB plasmiidilt), sest 50S fraktsioonid on suurenenud võrreldes metsiktüübiga. Polüsoomide profiili vähenemine viitab sellele, et ei toimu aktiivne translatsioon. Lisa A1067T mutatsiooniga mutatsioonide variandid näitasid, et kõikidel mutantidel on häiritud 50S assambleerumine ja lisaks on polüsoomide fraktsioonid vähenenud.
3. Mutatsiooni sisaldavate 23S rRNA jaotus erinevates ribosoomi fraktsioonides näitas, et suurem arv mutatsiooniga 23S rRNA-d on 50S subühiku fraktsioonis.

Mutagenesis analysis of the 23S rRNA tertiary interaction region

Natalja Garber

Summary

Ribosome is a complicated and a large complex, which consists of the RNA and proteins. Ribosome has been identified in all organisms. Bacterial ribosome consists of two subunits small 30S and large 50S. Large subunit of the bacterial ribosome is composed of the 23S rRNA, 5S rRNA and r-proteins. 23S rRNA is composed of six domains, which interact with the r-proteins and the 5S rRNA, to make the functional 50S subunit. In 23S rRNA in domain II 1130 region, which is located close to GTPase center, in which mutations can lead to the decrease of the ribosomal activity (Baranov et al., 1998).

Translation or protein synthesis is a process that is central in cellular function and moreover is conserved among all living organisms. In the „central dogma“ of molecular biology it is the last step, in which information is transferred from DNA to protein (Zouridis and Hatzimanikatis, 2007).

The aim of this study was to analyse the effect of the mutations, in 1130 region, which is located in 23S rRNA domain II, on the ribosome. The main results of this study are:

1. Both plasmids carrying mutations showed defects in the growth phenotype. Especially 23S rRNA mutants G1128A and U1130A, which were expressed from pTBSB plasmid, and mutant U1130C, which was expressed from pTB plasmid.
2. Results from centrifugation of the sucrose gradient showed: 23S rRNA mutants from pTBSB plasmid U1130A, U1130G and U1132C have influence to 50S subunit assembly, but their polysome fractions did not show the decrease of the translation rate. 23S rRNA mutant U1132C from pTB plasmid showed 50S subunit assembly defect. Introduction of extra mutation A1067T showed serious problems in translation activity and ribosome assembly.

3. Distribution of 23S rRNA with mutations in the different ribosomal fraction showed that the number of incorrectly assembled 23S rRNA was more in 50S subunit fraction.

Tänuavaldused

Tänan eelkõige oma juhendajat Margus Leppikut ja proffessor Jaanus Remmet, kes on alati olnud abivalmis ning nõudlikud minu juhendamisel ja töö koostamisel. Lisaks tänan kogu molekulaarbioloogia ja biokeemia õppetooli rõõmsa meele ja heade nõuannate eest. Veel tänan oma vanemaid, kes võimaldasid mul tulla Tartusse õppima.

Kasutatud kirjandus

Artiklid:

- Achenbach, J. and Nierhaus, K.H. (2013). Translocation at work. *Nat Struct Mol Biol.* 20(9): 1019-22.
- Agirrezabala, X. and Frank, J. (2009). Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Q Rev Biophys.* 42(3): 159-200.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289: 905–920.
- Baranov, P.V., Gurvich, O.L, Bogdavon, A.A., Brimacombe, R., Dontsova, O.A. (1998). New features of 23S ribosomal RNA folding: the long helix 41-42 makes a "U-turn" inside the ribosome. *RNA.* 4(6): 658-68.
- Beringer, M. and Rodnina, M.V. (2007). The ribosomal peptidyl transferase. *Mol Cell.* 26(3): 311-21.
- Bocchetta, M., Xiong, L., Mankin, A.S. (1998). 23S rRNA positions essential for tRNA binding in ribosomal functional sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(7): 3525-30.
- Borg, A., Pavlov, M., Ehrenberg, M. (2016). Complete kinetic mechanism for recycling of the bacterial ribosome. *RNA.* 22(1): 10-21.
- Brimacombe, R. and Stiege, W. (1985). Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem J.* 229: 1-17.
- Briones, E., Briones, C., Remacha, M., Ballesta, J.P. (1998). The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem.* 273(48): 31956-61.
- Brock, S., Szkaradkiewicz, K., Sprinzi, M. (1998). Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. *Mol Microbiol.* 29(2): 409-17.

Brown, P.H. and Schuck, P. (2006). Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Biophys J.* 90(12): 4651-61.

Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* 407: 340–348.

Charette, M. and Gray, M. W. (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUMBM Life.* 49(5): 341-351.

Clemons, W.M.Jr., May J.L., Wimberly, B.T., McCutcheon, J.P., Capel, M.S., Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature.* 400(6747): 833-40.

Cole, J.R., Olsson, C.L., Hershey, J.W., Grunberg-Manago, M., Nomura, M. (1987). Feedback regulation of rRNA synthesis in *Escherichia coli*. Requirement for initiation factor IF2. *J Mol Biol.* 198(3): 383-92.

Connell, S. and Nierhaus, K. (2000). Translational termination not yet at its end. *Chembiochem.* 1(4): 250-3.

Dinos, G., Kalpaxis, D.L., Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. (2005). Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Res.* 33(16): 5291-6.

Dohme, F. and Nierhaus, K. H. (1976). Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia coli* Ribosomes in vitro. *J Mol Biol* 107: 585-599.

Frank, J. (2000). The ribosome — a macromolecular machine par excellence. *Chem. Biol* 7: 133-141.

Frank, J. and Spahn, C.M.T. (2006). The ribosome and the mechanism of protein synthesis. *Rep. Prog. Phys.* 69(5): 1383-1417.

Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S.M., Van Roey, P., Agrawal, R.K., Harvey, S.C., Sali, A., Chapman, M.S., Frank, J. (2003). Study of the structural dynamics of the *E coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell.* 113(6): 789-801.

Garber, N. (2014). Kimäärse pseudouridiini süntaasi spetsiifika iseloomustamine. Tartu Ülikool.

Gutgsell, N.S., Deutscher, M.P. and Ofengand, J. (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*. *RNA*. 11: 1141–1152.

Helgstrand, M., Mandava, C.S., Mulder, F.A., Liljas, A., Sanyal, S., Akke, M. (2007). The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *J Mol Biol*. 365(2): 468-79.

Herold, M. and Nierhaus, K.H. (1987). Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem*. 262(18): 8826-33.

Hury, J., Nagaswamy, U., Larios-Sanz, M., Fox, G.E. (2006). Ribosome origins: the relative age of 23S rRNA Domains. *Orig Life Evol Biosph*. 36(4): 421-9.

Janssen, B.D., Diner, E.J., Hayes, C.S. (2012). Analysis of aminoacyl- and peptidyl-tRNAs by gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 905: 291-309.

Kaczanowska, M. and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71: 477-494.

Klein, D.J., Moore, P.B. and Steitz, T. A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol*. 340(1): 141-77.

La Teana, A., Pon, C.L., Gualerzi, C.O. (1996). Late events in translation initiation. Adjustment of fMet-tRNA in the ribosomal P-site. *J Mol Biol*. 256(4): 667-75.

Lafontaine, D.L. and Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(7): 514-20.

Leppik, M. (2007). Pseudouridiini süntaasi RluD substraadi spetsiifilisus *in vivo* ja *in vitro*. Tartu Ülikool.

Li, W., Sengupta, J., Rath, B.K., Frank, J. (2006). Functional conformations of the L11-ribosomal RNA complex revealed by correlative analysis of cryo-EM and molecular dynamics simulations. *RNA*. 12(7): 1240-53.

Ling, C. and Ermolenko, D.N. (2015). Initiation factor 2 stabilizes the ribosome in a semirotated conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(52):15874-9.

Liu, Q. and Fredrick, K. (2015). Roles of helix H69 of 23S rRNA in translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(37): 11559-64.

Márquez, V., Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. (2002). Functions and interplay of the tRNA-binding sites of the ribosome. *Biochem Soc Trans*. 30(2): 133-40.

Miyoshi, T. and Uchiumi, T. (2008). Functional interaction between bases C1049 in domain II and G2751 in domain VI of 23S rRNA in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Res*. 36 (6): 1783-91.

Moazed, D., Samaha, R.R., Gualerzi, C., Noller, H.F. (1995). Specific protection of 16S rRNA by translational initiation factors. *J Mol Biol*. 248(2): 207-10.

Myasnikov, A.G., Simonetti, A., Marzi, S., Klaholz, B.P. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr Opin Struct Biol*. 19(3): 300-9.

Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., Piendl, W., Selmer, M., Liljas, A., Drygin, D., Zimmermann, R., Garber, M. and Nikonov, S. (2003). Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature Struct Biol*. 10: 104 – 108.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore P. B. and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289: 920-30.

Noller, H.F., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baumcom, A., Cate, J.H. (2002). Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett*. 514 (1): 11-6.

Ofengand, J., Del Campo, M. and Kaya, Y. (2001). Mapping pseudouridines in RNA molecules. *Methods*. 25: 365–73.

Petrov, A.S., Bernier, C.R., HersHKovits, E., Xue, Y., Waterbury, C.C., Hsiao, C., Stepanov, V.G., Gaucher, E.A., Grover, M.A., Harvey, S.C., Hud, N.V., Wartell, R.M., Fox, G.E., Williams, L.D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 41(15): 7522-35.

Polacek, N. and Mankin, A.S. (2005). The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40(5): 285-311.

Pon, C.L. and Gualerzi, C.O. (1984). Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiation factor IF1 on the initial rate of 30 S initiation complex formation. *FEBS Lett.* 175(2): 203-7.

Pon, C.L., Wittmann-Liebold, B., Gualerzi, C. (1979). Structure--function relationships in *Escherichia coli* initiation factors. II. Elucidation of the primary structure of initiation factor IF-1. *FEBS Lett.* 101(1): 157-60.

Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell.* 108: 557-572.

Rodnina, M. V., Beringer, M. and Wintermeyer, W. (2006). How ribosomes make peptide bonds. *TIBS* 32: 20-26.

Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. (2016). Protein elongation, co-translational folding and targeting. *J Mol Biol* S0022-2836(16): 30001-8.

Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell.* 102: 615–623.

Selmer, M., Al-Karadaghi, S., Hirokawa, G., Kaji, A., Liljas, A. (1999). Crystal structure of *Thermotoga maritima* ribosome recycling factor: a tRNA mimic. *Science.* 286(5448): 2349-52.

Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualrezi, C.O., Boelens, R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from *E.coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* 16(6): 1436-43.

Shi, X., Khade, P.K., Sanbonmatsu, K.Y., Joseph, S. (2012). Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. *J Mol Biol.* 419(3-4): 125-38.

Zhao, Q., Öfverstedt, L.-G., Skoglund, U. and Isaksson, L.A.(2004). Morphological variation of individual *Escherichia coli* 50S ribosomal subunits in situ, as revealed by cryo-electron tomography. *Exp Cell Res.* 300: 190–201.

Talkington, M.W., Siuzdak, G., Williamson, J.R. (2005). An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 438(7068): 628-32.

Tomšić, J., Vitali, L.A., Daviter, T., Savelsbergh, A., Spurio, R., Stiebeck, P., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., Gualerzi, C.O. (2000). Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis. *EMBO J.* 19(9): 2127-36.

Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., Frank, J. (2003). Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell.* 114(1): 123-34.

Wilson, D.N. and Nierhaus, K.H. (2003). The ribosome through the looking glass. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42: 3464-3486.

Wilson, D.N., Blaha, G., Connell, S. R., Ivanov, P. V., Jenke, H., Stelzl, U., Teraoka, Y. and Nierhaus, K. H. (2002). Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. *Curr Protein Pept Sci.* 3: 1-53.

Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons Jr, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonnrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 407: 327–39.

Wittmann, H. G. (1982). Components of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 51: 155-183.

Voorhees, R.M and Ramakrishnan, V. (2013). Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu Rev Biochem.* 82: 203-36.

Vornlocher, H.P., Scheible, W.R., Faulhammer, H.G., Sprinzi, M. (1997). Identification and purification of translation initiation factor 2 (IF2) from *Thermus thermophilus*. *Eur J Biochem.* 243(1-2): 66-71.

Wu, X.Q., Iyengar, P., RajBhandary, U.L. (1996). Ribosome-initiator tRNA complex as an intermediate in translation initiation in *Escherichia coli* revealed by use of mutant initiator tRNAs and specialized ribosomes. *EMBO J.* 15(17): 4734-9.

Xu, Z and Culver, G.M. (2010). Differential assembly of 16S rRNA domains during 30S subunit formation. *RNA.* 16(10): 1990-2001.

Yusupov, M.M., Yusupova, G. Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D. and Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science.* 292: 883–896.

Zouridis, H. and Hatzimanikatis, V. (2007). A model for protein translation: polysome self-organization leads to maximum protein synthesis rates. *Biophys J.* 92(3): 717-30.

Raamatud:

Arnstein, H. R. V. and Cox, R. A. 1992. The ribosome cycle and translation of the genetic message, p.57-70. *In* H. R. V. Arnstein and R. A. Cox, *Protein biosynthesis*, IRL Press, New York.

Gualerzi, C. O., Brandi, L., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomšić, J. and Pon, C. L. 2000. Translation initiation in bacteria, p.487-492. *In* R. A. Garrett, S. R. Douthwaite, A. Liljas, A. T. Matheson, P. B. Moore and H. E. Noller (ed.), *The ribosome: structure, function antibiotics and cellular interactions*, ASM Press, Washington, D.C.

Wilson, D. N., Dalphin, M. E., Pel, H. J., Major, L. L., Mansell, J. B. and Tate, W. P. 2000. Factor-mediated termination of protein synthesis: a welcome return to the mainstream of translation, p.496-499. *In* R. A. Garrett, S. R. Douthwaite, A. Liljas, A. T. Matheson, P. B. Moore and H. E. Noller (ed.), *The ribosome: structure, function antibiotics and cellular interactions*, ASM Press, Washington, D.C.

Kasutatud veebiaadressid

https://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg_unit.html

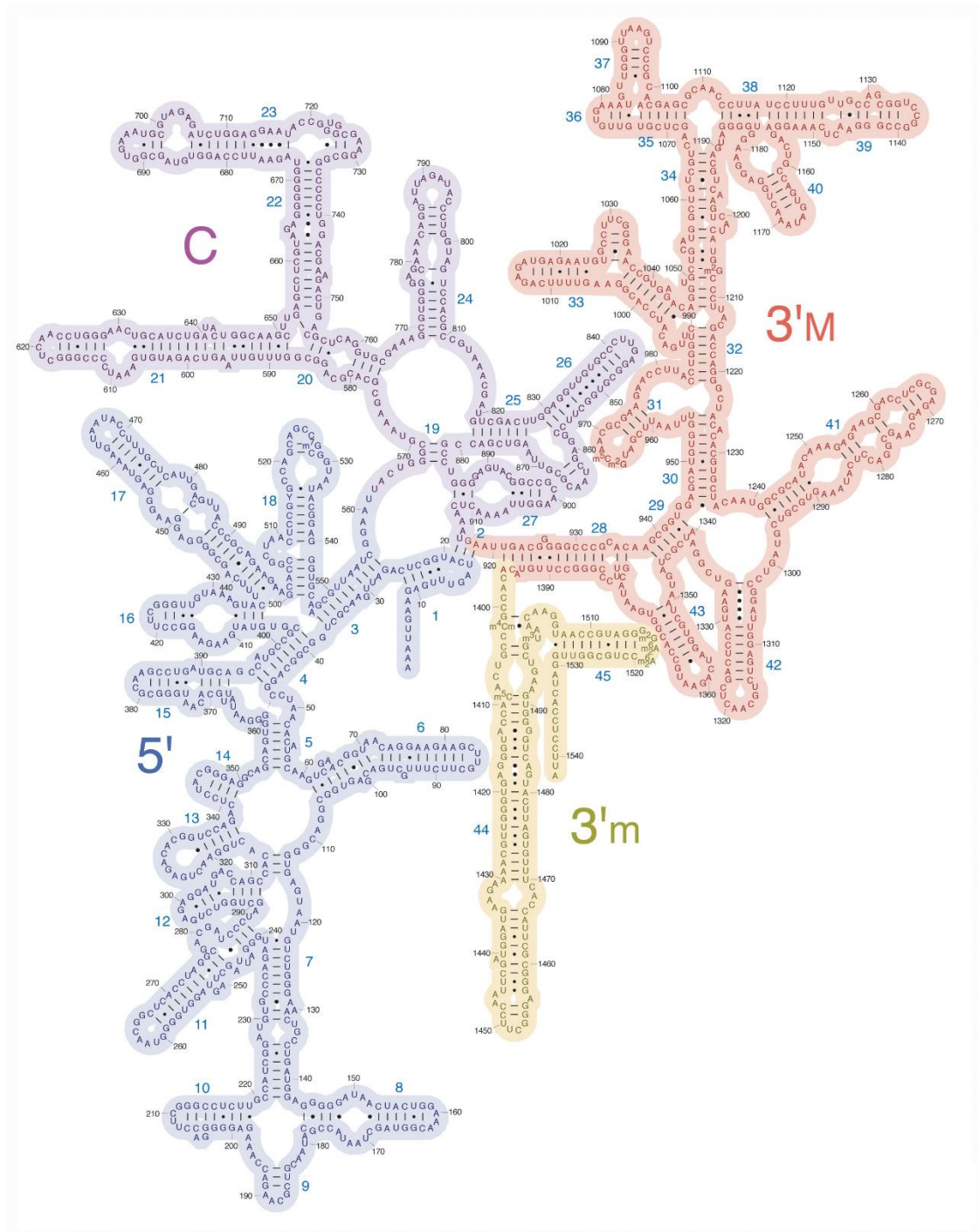
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22335/#A4167>

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/502158/ribosomal-RNA-rRNA>

Lisad

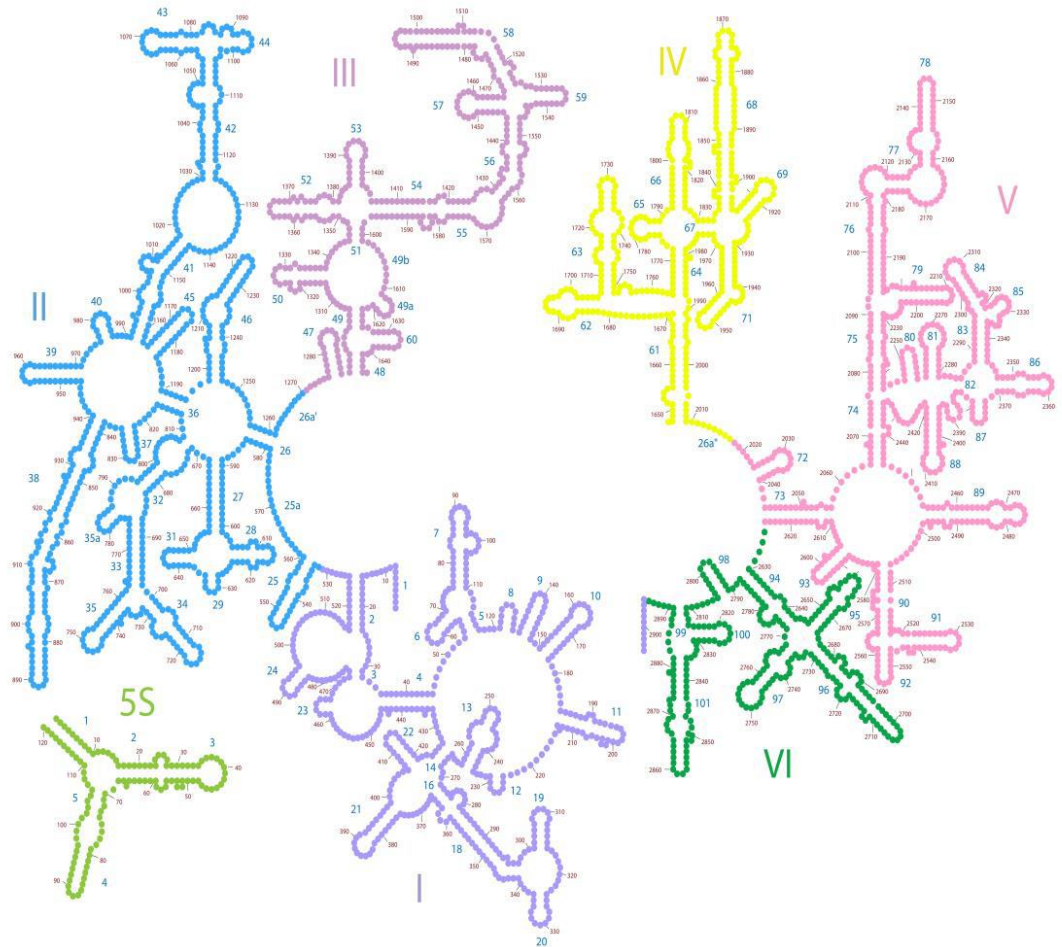
Lisa 1

Escherichia coli väikse ribosomaalse RNA subühiku sekundaarstruktuur (http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html). Sekundaarstruktuuri 5', tsentraalne (C), 3' suur (3'M) ja 3' väike (3'm) domeen on vastavalt tähistatud.



Lisa 2.

Escherichia coli suure ribosomaalse rRNA subühiku sekundaarstruktuur (<http://apollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery/>). Sekundaarstruktuuri kuus domeenid: I (violetne); II (helesinine); III (lilla); IV (kollane); V (roosa); VI (tumeroheline) ja 5S rRNA (heleroheline) on vastavalt tähistatud.



Lihtlitsents

Mina Natalja Garber

15.04.1991

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

23S rRNA tertsiaarse interaktsiooni piirkonna mutatsioonanalüüs

mille juhendaja on PhD Margus Leppik

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016